



Съвет на
Европейския съюз

Брюксел, 25 февруари 2019 г.
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

ПРИДРУЖИТЕЛНО ПИСМО

От:	Европейската комисия
Дата на получаване:	22 февруари 2019 г.
До:	Генералния секретариат на Съвета
№ док. Ком.:	Annex to D060575/02
Относно:	РЕГЛАМЕНТ (ЕС) .../... НА КОМИСИЯТА от XXX година за изменение, с цел адаптиране към техническия прогрес, на приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

Приложено се изпраща на делегациите документ Annex to D060575/02.

Приложение: Annex to D060575/02

Приложение 1 — Част 1/2

BG

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се изменя, както следва:

1) В Част Б глава Б.5 се заменя със следното:

„Б.4 ОСТРО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ КОЖАТА**ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 404 (2015). Насоките на ОИСП за изпитването на химикали се преразглеждат периодично, за да се гарантира, че отразяват възможно най-добрите налични научни постижения. При преразглеждането на ОИСП TG 404 специално внимание беше обърнато на възможностите за усъвършенстване във връзка с осигуряване хуманно отношение към опитните животни и с цялостната оценка на съществуващата информация за изпитвания химикал с цел избягване на ненужно изпитване върху опитни животни. Актуализираната версия на TG 404 на ОИСП (първоначално приета през 1981 г., преразгледана през 1992 г., 2002 г. и 2015 г.) включва препратка към Ръководството за интегрирани подходи към изпитването и оценката (IATA) на дразнещото и корозивното действие върху кожата (1), в който се предлага модулен подход за изпитване за дразнещо и за корозивно действие върху кожата. IATA описва няколко модула, които обединяват източници на информация и инструменти за анализ, и предоставя насоки за i) как да се интегрират и използват съществуващите данни за изпитвания и различни от тези за изпитвания за оценка на на потенциала на химикалите за дразнене на кожата и за корозивно действие върху кожата, и ii) предлага подход, когато е необходимо по-нататъшно изпитване (1). В допълнение, когато е необходимо, в това указание се препоръчва последователното вместо едновременното прилагане на трите пластира от изпитването случая към животното при първоначалното изпитване *in vivo*.
2. Определенията за дразнещо кожно действие и за корозивно действие са посочени в допълнението към настоящия метод за изпитване.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

3. В интерес и на научната стойност на проучването, и на хуманното отношение към животните е да не се предприема провеждането на изпитване *in vivo* преди да бъдат

оценени в основан на тежестта на доказателствата анализ всички налични данни, относими към потенциалното корозивно/дразнещо действие на изпитвания химикал върху кожата, както е представено в Ръководството за интегрирани подходи към изпитването и оценката на дразнещото и корозивното действие върху кожата, т.е. в трите части на настоящите насоки и съответните им модули (1). Накратко, в част 1 съществуващите данни са разгледани в рамките на седем модула, обхващащи данни за хора, данни *in vivo*, данни *in vitro*, данни за физичните/химичните свойства (например рН, по-специално силна киселинност или алкалност) и методи, различни от изпитване. По част 2 се извършва основан на тежестта на доказателствата анализ (WoE анализ). Ако този WoE анализ все още не позволява да се даде заключение, част 3 следва да се проведе с допълнително изпитване, като се започне от методите *in vitro*, а *in vivo* изпитване се използва като крайна мярка. Този анализ следователно трябва да доведе до намаляване на необходимостта от извършване на изследвания *in vivo* за оценка на дразнещо/корозивно действие на изпитваните химикали върху кожата, за които вече съществуват достатъчно доказателства от други проучвания относно тези две крайни точки.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО *IN VIVO*

4. Изпитваният химикал се прилага в еднократна доза върху кожата на опитно животно; участъци от кожата на животното, които не са третирани, служат като контрола. През определени интервали от време се отчита и оценява степента на дразнещо/корозивно действие и тя се описва подробно, за да може да се извърши цялостна оценка на ефектите. Продължителността на проучването следва да бъде достатъчно голяма, за да може да се направи преценка дали ефектите са обратими или не.
5. Животните, които показват трайни признаци на тежък стрес и/или болка в който и да е момент от изпитването, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин и изпитваният химикал следва да бъде съответно оценен. Критериите за вземане на решение за умъртвяване по хуманен начин на животните в терминално състояние и тези, които изпитват тежко страдание, са предмет на отделно ръководство (2).

ПОДГОТОВКА НА ИЗПИТВАНЕТО *IN VIVO*

Избор на животински вид

6. Предпочитаният вид опитни животни са зайците албиноси. Използват се млади, здрави, полово зрели животни. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано.

Подготовка на опитните животни

7. Приблизително 24 часа преди изпитването козината от дорзалната част на тялото на животните се отстранява чрез подстригване или бръснене. При подстригването или бръсненето кожата не следва да се охлузва, като се използват само животни със здрава, интактна кожа.
8. В козината на някои породи зайци има гъсто окосмени участъци, които са по-забележими през определени периоди от годината. Такива участъци с гъсто окосмяване не следва да се използват като място за изпитване.

Условия на отглеждане и хранене

9. Животните трябва да бъдат индивидуално настанени. В опитното помещение, в което се намират зайците, следва да се поддържа температура 20°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 %, освен по време на почистване на стаята, целта е относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. При храненето могат да се прилагат обичайните лабораторни диети, с неограничен достъп до питейна вода.

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Прилагане на изпитвания химикал

10. Изпитваният химикал се нанася върху малък участък от кожата (около 6 cm²) и се покрива с марля, която се прикрепва с помощта на лепенка, която не предизвиква дразнене на кожата. Когато не е възможно директно третиране (напр. при течности или някои пастообразни вещества), изпитваният химикал се нанася първо върху марлята, след което марлята се поставя върху кожата. През периода на експозиция марлята следва да се задържи в контакт с кожата, без да е притисната силно, с помощта на подходяща полуоклузивна превръзка. Когато изпитваният химикал се нанася върху марлята, тя следва да бъде прикрепена към кожата по такъв начин, че да се осигури плътен контакт и равномерно разпределение на изпитвания химикал върху кожата. Достъпът на животното до марлята и поглъщането или вдишването на изпитвания химикал следва да бъдат предотвратени.
11. Течните изпитвани химикали обикновено се използват неразредени. Когато се изпитва твърдо вещество (което може да се стрие на прах, ако това е необходимо), изпитваният химикал следва да се навлажни с възможно най-малкото количество вода (или, при нужда, друг подходящ носител), което е достатъчно, за да се постигне плътен контакт с кожата. Когато се използва друг носител освен водата, той следва да не оказва влияние върху кожното дразнене, предизвикано от изпитваното вещество, или влиянието му следва да бъде минимално.

12. В края на периода на експозиция (обикновено 4 часа) остатъкът от изпитвания химикал се отстранява от кожата, когато това е възможно, с вода или подходящ разтворител, без да се променя съществуващата кожна реакция или да се нарушава целостта на епидермиса.

Доза

13. Към мястото на изпитване се прилага доза от 0,5 ml течност или 0,5 g твърд материал или паста.

Първоначално изпитване (*in vivo* изпитване за дразнещо/корозивно действие върху кожата с използване на едно опитно животно)

14. Когато е преценено, че даден изпитван химикал е корозивен, дразнещ или неклассифициран на базата на основан на тежестта на доказателствата анализ или на предишни изпитвания *in vitro*, обикновено не е необходимо провеждането на допълнителни *in vivo* изпитвания. Въпреки това в случаите, когато има основания за допълнителна информация, изпитването *in vivo* се извършва първоначално с използване на едно животно и с прилагане на следния подход. При изпитването върху животното се прилагат последователно до три марли. Първия път превръзката и марлята се отстраняват след три минути. Ако не се наблюдава сериозна кожна реакция, на друго място се прилага марля втори път, и се отстранява след един час. Ако наблюденията на този етап показват, че експозицията може да бъде удължена до 4 часа, като се спази принципът за хуманно отношение към животните, се прилага трета марля за четири часа, след което се отстранява и се оценява степента на реакцията.
15. Когато след една от трите последователни експозиции се открие корозивен ефект, изпитването се прекратява веднага. Когато след отстраняването на третата марля не се наблюдава корозивен ефект, опитното животно се проследява в продължение на 14 дни, освен ако на по-ранен етап не се появят корозивни промени.
16. В случаите, когато не се очаква изпитваният химикал да прояви корозивно действие, но може да предизвика дразнене, третирането се провежда върху едно животно с една марля за четири часа.

Потвърдително изпитване (*in vivo* изпитване за кожно дразнещо действие с използване на допълнителни опитни животни)

17. Когато при първоначалното изпитване не се установява корозивен ефект, наблюдаваните прояви на дразнене или отрицателната реакция следва да бъдат потвърдени, като се извърши еднократно третиране на най-много две допълнителни животни, всяко с една марля, за 4 часа. Ако при първоначалното изпитване са отчетени прояви на дразнене, потвърдителното изпитване може да се извърши последователно или с експозиция едновременно върху две допълнителни опитни

животни. Когато по изключение не е проведено първоначално изпитване, могат да се третират две или три животни, като на всяко животно се прави по една апликация за 4 часа. Когато се използват две животни и при двете се наблюдава една и съща реакция, не е необходимо по-нататъшно продължаване на изпитването. В обратния случай се третира и трето допълнително животно. При получаване на противоречиви резултати може да се наложи използването на още допълнителни животни.

Период на наблюдение

18. Продължителността на периода на наблюдение следва да бъде достатъчна за пълната оценка на обратимостта на наблюдаваните ефекти. Въпреки това изпитването следва да се прекрати във всеки момент, когато животните покажат трайни признаци на силна болка или стрес. За да се установи дали ефектите са обратими, животните се наблюдават до 14 дни след отстраняването на марлите. Ако преди края на 14-дневния период се установи, че промените са обратими, изпитването се прекратява в момента, когато това е установено.

Клинични наблюдения и оценка на кожните реакции

19. Всички животни се преглеждат за признаци на еритема и едем и реакциите се оценяват 60 минути, а след това 24, 48 и 72 часа след отстраняването на марлите. При първоначалното изпитване върху едно животно също така изпитваният участък се преглежда незабавно след отстраняването на превръзката и марлята. Кожните реакции се оценяват и отчитат според скалата, дадена в таблица 1. Когато до 72-рия час не може да се определи дали настъпилото увреждане на кожата е проява на дразнещо или корозивно действие, може да е необходимо наблюдението да продължи до 14-ия ден, за да се определи дали промените са обратими. Освен признаците на дразнене следва да се опишат подробно и всички локални токсични прояви (напр. изсушаване на кожата) и системни неблагоприятни ефекти (напр. клинични симптоми на токсичност, промени в телесната маса). Когато е необходимо да се изяснят противоречиви резултати, следва да се използва хистопатологично изследване.
20. Оценяването на кожните промени е субективен процес. За да се постигне съответствие в оценките при класифицирането на кожните реакции и да се подпомогнат лабораториите, в които се провеждат изпитвания, и лицата, участващи в извършването на изпитването и тълкуването на резултатите, персоналът, извършващ наблюдението, е необходимо да бъде добре обучен да прилага класификационната скала (вж. таблицата по-долу). Може да е полезно използването на илюстрирано ръководство за оценка на проявите на кожно дразнене и други увреждания (3).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

21. В окончателния протокол от изпитването получените резултати от изследването следва да се обобщят в табличен вид и следва да включват всички данни, посочени в параграф 24.

Оценка на резултатите

22. Баловата оценка на кожното дразнене следва да се разглежда във връзка с вида, тежестта и обратимостта или необратимостта на уврежданията. Индивидуалната балова оценка не е единственият критерий за определяне на дразнещите свойства на даден материал, той като се оценяват и други ефекти на изпитвания материал. Вместо това индивидуалният бал следва да се разглежда като референтна стойност, която трябва да се оценява съвместно с всички други наблюдения от проучването.
23. При оценката на дразнещия ефект следва да се има предвид дали кожните увреждания са обратими или не. Когато реакции като алоpecia (в ограничени участъци), хиперкератоза, хиперплазия и излющване на кожата се задържат до края на 14-дневния период на наблюдение, изпитваният химикал следва да се класифицира като дразнещ.

Протокол от изпитването

24. Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Обосновка на изпитването in vivo:

- основан на тежестта на доказателствата анализ на съществуващите данни от изпитвания, включително резултатите от прилагането на стратегията за последователно изпитване;
- описание на относимите данни от предходни изпитвания;
- данни, получени при всеки етап от стратегията за изпитване;
- описание на извършените *in vitro* изпитвания, включително подробно представяне на процедурите за изпитване и резултатите, получени при прилагане на изпитваните/референтните вещества;
- основан на тежестта на доказателствата анализ с оглед извършване на *in vivo* проучване.

Изпитван химикал:

- Вещество с една съставка: химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.;

- Вещество с повече съставки, смес и вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали (UVCB). определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични/химични свойства на съставките;
- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- източник, номер на партидата, при наличност;
- Обработка на изпитвания химикал/веществото за контроли преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна;
- Условия за съхранение.

Носител:

- химично идентифициране, концентрация (когато е необходимо), използван обем;
- обосноваване на избора на носител.

Изпитвано животно (животни):

- използван вид/порода, обосновка за използване на животни, различни от зайци албиноси;
- брой на животните от всеки пол;
- индивидуална телесна маса на всяко животно в началото и в края на изпитването;
- възраст на животните в началото на проучването;
- произход на животните, условия за отглеждане, диета и т.н.

Условия на изпитването:

- техника за подготовка на мястото за прилагане на пластира;
- подробно описание на естеството на използваните пластири и техники за прилагането им;
- подробности за приготвянето, прилагането и отстраняването на изпитвания химикал.

Резултати:

- таблица с баловите оценки на реакциите на дразнещо/корозивно действие за всяко животно във всички моменти на отчитане;
- описание на всички наблюдавани увреждания;

- описание в разказна форма на вида и степента на наблюдаваните прояви на дразнене/корозивно действие, както и на хистопатологичните находки;
- описание на други неблагоприятни локални (напр. изсушаване на кожата) и системни ефекти освен проявите на кожно дразнене и корозивно действие.

Обсъждане на резултатите

Заключения

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

ТАБЛИЦА: СКАЛА НА КОЖНИТЕ РЕАКЦИИ**Образуване на еритема и есхара**

Няма еритема.....	0
Много слаба еритема (едва забележима).....	1
Добре определена еритема.....	2
Умерена до тежка еритема.....	3
Тежка еритема (силно зачервяване — с цвят на цвекло) до образуване на есхара, което не позволява да се отчете балът на еритемата ...	4
Максимален бал:	4

Образуване на едем

Отсъствие на едем.....	0
Много лек едем (едва забележим).....	1
Лек едем (границите на едемния участък са видимо повдигнати и се очертават ясно)	2
Умерен едем (повдигнат около 1 mm).....	3
Тежък едем (подуване повече от 1 mm, което обхваща участък, по-голям от третирания)....	4
Максимален бал:	4

Когато е необходимо да се изяснят противоречиви резултати, може да се проведе хистопатологично изследване.

Допълнение

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химикал означава вещество или смес.

Кожно дразнене е предизвикването на обратимо увреждане на кожата вследствие на прилагането на изпитван химикал за период от време до 4 часа.

Корозия на кожата означава причиняването на необратимо увреждане на кожата; а именно видима некроза през епидермиса и в дермиса след прилагане на изпитван химикал в течение на не повече от 4 часа. Корозивните реакции се проявяват под формата на язви, кръвотечения, кървави струпеи и, към края на периода на наблюдение от 14 дни, обезцветяване, предизвикано от избледняване на кожата, цели участъци с алоpecia и белези. Хистопатологията трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните увреждания.

Изпитван химикал е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.“

В Част Б глава Б.47 се заменя със следното:

„Б.17 ИЗПИТВАНИЯ *IN VITRO* ЗА ГЕННИ МУТАЦИИ В КЛЕТКИ НА БОЗАЙНИЦИ, С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ГЕНИТЕ HPRT И XPRT

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване (МИ) е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП 476 (2016 г.). Методите за изпитване периодично се преразглеждат в светлината на научния прогрес, променящите се регулаторни нужди и хуманното отношение към животните. Настоящата преработена версия на МИ Б.17 отразява почти тридесет години опит с това изпитване и също така произтича от разработването на отделен нов метод, предназначен за изпитвания *in vitro* за генни мутации в клетки на бозайници, с използване на гена на тимидинкиназата. МИ Б.17 е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на последните промени, направени в насоките за изпитване на ОИСП за генетична токсичност (1).
2. Целта на изпитванията *in vitro* за генни мутации в клетки на бозайници е откриването на генни мутации, предизвикани от химикали. Клетъчните линии, използвани в тези изпитвания, измерват прави мутации в репортерни гени, по-специално гена на ендогенната хипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (Hprt в клетки на гризачи, HPRT в човешки клетки; общо наричани ген Hprt и HPRT изпитване в настоящия метод за изпитване), както и трансгена на ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазата (gpt) (наричан XPRT изпитване). Изпитванията за мутации HPRT и XPRT откриват различни спектри на генетични събития. В допълнение към мутационните събития, открити по време на HPRT изпитването (напр. заместване на двойка бази, мутации с изместване на рамката на разчитане, малки делеции и инсерции), автозомното разполагане на gpt трансгена може да позволи откриването на мутации, които са резултат от големи делеции и евентуално митотична рекомбинация, които не са открити с HPRT изпитването, тъй като генът Hprt се намира върху X-хромозомата (2) (3) (4) (5) (6) (7). Понастоящем XPRT се използва в по-малка степен за регулаторни цели, отколкото HPRT изпитването.

3. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. *In vitro* изпитванията по принцип изискват екзогенен източник на метаболитно активиране. Екзогенната система на метаболитно активиране не възпроизвежда изцяло *in vivo* условия.

5. Следва да се вземат мерки за избягване на условия, които биха довели до изкуствено възникнали положителни резултати (т.е. възможно взаимодействие със системата за изпитване), които не са причинени от прякото взаимодействие между изпитваните химикали и генетичния материал на клетката; такива условия включват промени в рН или осмолалитета (8) (9) (10), взаимодействие с компонентите на средата (11) (12) или прекомерно високи нива на цитотоксичност (13). Цитотоксичността, надвишаваща препоръчаните горни нива на цитотоксичност, както е определено в точка 19, се счита за прекомерна за HPRT изпитването.
6. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

7. Мутантните клетки с недостатъчна Hprt ензимна активност при HPRT изпитването или xprt ензимна активност при XPRT изпитването са устойчиви на цитостатичните ефекти на пуриновия аналог 6-тиогуанин (TG). Клетките с достатъчна Hprt активност (при HPRT изпитването) или gpt активност (при XPRT изпитването) са чувствителни към TG, което причинява инхибиране на клетъчния метаболизъм и спира по-нататъшното клетъчно деление. Така мутантните клетки са способни да пролиферират в присъствието на TG, докато обикновените клетки, които съдържат Hprt (при HPRT изпитването) или gpt активност (при XPRT изпитването), не са.
8. Клетките в суспензия или Монослойните култури се експонират на изпитвания химикал както със, така и без екзогенен източник на метаболитно активиране (вж. точка 14), за подходящ период от време (3—6 часа), след което се правят субкултури, за да се определи цитотоксичността и да се даде възможност за фенотипна експресия преди избора на мутант (14) (15) (16) (17). Цитотоксичността се определя от относителната преживяемост (RS), т.е. ефективността на клониране, измерена непосредствено след третирането, и коригирана за всяка загуба на клетка по време на третирането в сравнение с отрицателната контрола (точка 18 и допълнение 2). Третираните култури се поддържат в среда на растеж за достатъчен период от време, характерен за всеки избран клетъчен тип, за да се осигури почти оптимална фенотипна експресия на индуцираните мутации. След фенотипната експресия честотата на мутантите се определя чрез посяване на предварително известни количества клетки в среда, съдържаща селективния агент, за да се открият мутантни колонии, и в среда без селективен агент, за да се определи ефикасността на клониране (жизнеспособността). След подходящ инкубационен период колонииите се преброяват. Честотата на мутантите се изчислява въз основа на броя на мутантните

колонии, коригиран с ефикасността на клониране към момента на подбора на мутантите.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Подготовка

Клетки

9. Типовете клетки, използвани за изпитванията за мутации HPRT и XPRT, трябва да имат доказана чувствителност към химични мутагени, висока ефикасност на клониране, стабилен кариотип и стабилна честота на спонтанните мутации. Най-често използваните клетки за HPRT изпитването включват линиите CHO, CHL и V79 на клетки на китайски хамстер, L5178Y на миши лимфомни клетки и ТК6 на човешки лимфобластни клетки (18) (19). За XPRT изпитването се използват получени от CHO AS52 клетки, които съдържат gpt трансгена (със загубен след делеция Hprt ген) (20) (21); HPRT изпитването не може да се извърши в клетки AS52, тъй като генът HPRT е загубен след делеция. Използването на други клетъчни линии следва да бъде обосновано и валидирано.
10. Клетъчните линии следва да се проверяват рутинно за стабилност на модалния брой на хромозомите и отсъствие на замърсяване от Mycoplasma (22) (23), и клетките не следва да се използват, ако са замърсени или ако има промени в модалния брой на хромозомите. Нормалната продължителност на клетъчния цикъл, използвана в лабораторията, провеждаща изпитването, следва да бъде установена и следва да съответства на публикуваните характеристики на клетките. Следва да се провери и честотата на спонтанните мутации в първичните клетъчни банки и банките не следва да се използват, ако честотата на мутантите не е приемлива.
11. Преди употреба в това изпитване културите може да се нуждаят от почистване от вече съществуващи мутантни клетки, напр. чрез култивиране в среда НАТ за HPRT изпитването и МРА за XPRT изпитването (5) (24) (вж. допълнение 1). Почистените клетки могат да бъдат криогенно съхранени и след това размразени, за да се използват като работни банки. Новоразмразените работни банки могат да се използват за изпитването след достигане на обичайните времена за удвояване. При провеждане на XPRT изпитването рутинната култура на клетки AS52 следва да използва условия, които осигуряват поддържането на gpt трансгена (20).

Среди и условия за отглеждане на културата

12. За отглеждането на културите трябва да бъдат използвани подходящи среда за отглеждане и инкубационни условия (съдове за отглеждане, влажна атмосфера с 5 % CO₂ и температура на инкубиране от 37 °C). Клетъчните култури следва винаги да се поддържат при условия, които осигуряват отглеждането им в логаритмична фаза.

Особено важно е средите и условията за отглеждане на културите да се подберат така, че да осигуряват оптимален растеж на клетките по време на периода на експресия и на оптимална ефикасност на клонирането както за мутантни, така и за немутантни клетки.

Приготвяне на културите

13. размножават се клетъчни линии от изходни култури, посяват се в среда за отглеждане с такава посевна гъстота, че клетките в суспензии или в монослое да продължат експоненциалния си растеж през периодите на третиране и експресия (напр. сливането следва да се избягва при клетки, отглеждани в монослое).

Метаболитно активиране

14. При използването на клетки с недостатъчен ендегенен капацитет за метаболизиране следва да се използват екзогенни метаболизиращи системи. Най-често използваната система, която се препоръчва по подразбиране, освен ако няма основание за друго, е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черен дроб на гризачи (обикновено плъхове), третирани с ензимно индуциращи агенти като Ароклор 1254 (25) (26) (27) (28) или съчетание от фенотарбидил и β -нафтофлауон (29) (30) (31) (32). Последното съчетание не противоречи на Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители (33) и е доказано, че е също толкова ефективно, колкото Ароклор 1254, за индуцирането на оксидаци със смесени функции (29) (31). Фракцията S9 обикновено се използва в концентрации, вариращи от 1 до 2 % (v/v), но може да се увеличи до 10 % (v/v) в окончателната среда за изпитване. Изборът на типа и концентрацията на използваната екзогенна система за метаболитно активиране или метаболитен индуктор може да бъде повлиян от класа вещества, който се изпитва (34) (35) (36).

Приготвяне на химикала за изпитване

15. Твърдите изпитвани химикали следва да се подготвят в подходящи разтворители и, ако е необходимо, да се разреждат преди третиране на клетките (вж. точка 16). Течните химикали за изпитване могат да се добавят директно в системата за изпитване и/или да се разреждат преди третирането на системата за изпитване. Газообразните или летливите химикали за изпитване следва да бъдат изпитвани чрез подходящи изменения на стандартните протоколи, като например третиране в запечатани съдове за отглеждане (37) (38). Приготвянето на изпитвания химикал следва да се извърши непосредствено преди третирането, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ

Разтворители

16. Разтворителят трябва да бъде избран с цел оптимизиране на разтворимостта на изпитваните химикали, без да се оказва негативно влияние върху извършването на изпитването, като например промяна на клетъчния растеж, засягане на целостта на изпитвания химикал, реакция със съдовете за отглеждане, нарушаване на системата за метаболитно активиране. Препоръчва се винаги, когато е възможно, най-напред да се разглежда възможността за използване на вода като разтворител (или среда за отглеждане). Добре утвърдени разтворители са например водата и диметилсулфоксидът. Като цяло органичните разтворители не следва да надвишават 1 % (об./об.), а водните разтворители (физиологичен разтвор или вода) не трябва да превишават 10 % (об./об.) в окончателната среда за третиране. Ако се използват разтворители, които не са добре утвърдени (напр. етанол или ацетон), използването им следва да бъде подкрепено от данни за съвместимостта им с изпитваните химикали и системата за изпитване, както и за това, че не са генетично токсични при използваната концентрация. При липса на подкрепящи данни е важно да се добавят нетретирани контроли (виж допълнение 1), за да се докаже, че избраният разтворител не предизвиква никакви неблагоприятни или мутагенни ефекти.

Измерване на цитотоксичността и избиране на концентрации на експозиция

17. При определяне на най-високата концентрация на изпитвания химикал следва да се избягват концентрациите, които могат да доведат до изкуствено предизвикан положителен отклик, като например предизвикващите прекомерна цитотоксичност (вж. точка 20), утаяване в средата за отглеждане (вж. точка 21) или явни промени в рН или осмолалитета (вж. точка 5). Ако изпитваният химикал предизвиква явна промяна в рН на средата към момента на добавянето, рН може да бъде коригиран чрез буфериране на окончателната среда за третиране, за да се избегнат изкуствено предизвикани положителни резултати и да се поддържат подходящи условия за отглеждане.
18. Изборът на концентрация се основава на цитотоксичността и на други съображения (вж. точки 20—22). Въпреки че оценката на цитотоксичността в първоначално изпитване може да бъде полезна за по-добро определяне на концентрациите, които ще се използват в главния опит, първоначалното изпитване не се изисква. Въпреки че се извършва първоначална оценка на цитотоксичността, измерването на цитотоксичността за всяка култура все още се изисква в основния експеримент. Цитотоксичността следва да се оценява с използване на RS, т.е. ефикасността на клониране (CE) на клетки, които са посетили непосредствено след третирането, с корекция за всякаква загуба на клетки по време на третирането, въз основа на броя на клетките, в сравнение с коригираната ефикасност на клониране в отрицателни контроли (на които е присвоена стойност 100 % за преживяемостта) (вж. допълнение 2 за формулата).

19. Следва да бъдат оценени най-малко четири концентрации на изпитване (без да се включват контролите на разтворител и положителните контроли), които отговарят на критериите за приемливост (подходяща цитотоксичност, брой на клетки и т.н.). Използването на култури с едно повторение е препоръчително, но за всяка изпитвана концентрация може да се използват култури или без повторение, или с повторения. Получените резултати в културите с независими повторения за дадена концентрация следва да се докладват отделно, но могат да бъдат обединени за анализа на данните (17). За изпитваните химикали, показващи слаба цитотоксичност, или не показващи цитотоксичност, обичайно са подходящи приблизително 2 до 3-кратни концентрационни интервали. Там, където се среща цитотоксичност, избраните изпитвани концентрации следва да са в обхват, в който се получава цитотоксичност, до концентрации, при които има умерена, слаба и нулева цитотоксичност. Множество изпитвани химикали показват стръмни криви концентрация-отклик и за да се обхване целият диапазон на цитотоксичност, или за да се проучи подробно връзката концентрация-отклик, може да е необходимо да се използват по-близко разположени концентрации и над четири концентрации, по-специално в ситуации, при които се изисква повтаряне на експеримента (вж. точка 43). Използването на повече от 4 концентрации може да бъде особено важно при използване на култури без повторение.
20. Ако максималната концентрация е базирана на цитотоксичност, най-високата концентрация следва да има за цел постигане между 20 и 10 % RS. Трябва да се внимава при тълкуването на положителните резултати, получени само при 10 % RS или по-малко (точка 43).
21. За малко разтворимите изпитвани химикали, които не са цитотоксични при концентрации, по-ниски от най-ниската неразтворима концентрация, най-високата анализирана концентрация трябва да предизвиква помътняване или утайка, видима с невъоръжено око или с помощта на инвертен микроскоп в края на третирането с изпитвания химикал. Дори ако цитотоксичността се наблюдава над най-ниската неразтворима концентрация, препоръчително е да се извърши изпитване само при една концентрация, която предизвиква помътняване или е с видима утайка, тъй като от утайката могат да се получат изкуствено предизвикани въздействия. При концентрацията, при която се получава утайка, следва да се вземат мерки, за да се гарантира, че утайката не пречи на провеждането на изпитването. Определянето на разтворимостта в средата за отглеждане преди началото на опита може да се окаже полезно.
22. Ако не се наблюдава утайка или ограничаваща цитотоксичност, най-високата изпитвана концентрация следва да съответства на 10 mM, 2 mg/ml или 2 µl/ml, в зависимост от това коя от стойностите е най-ниска (39) (40). Когато изпитваният химикал не е с определен състав, например вещество с неизвестен или променлив

състав, сложни продукти от реакции или биологични материали (т.е. химични вещества с непознат или променлив състав (UVCB) (41), екстракти от околната среда и други, може да е необходимо най-високата концентрация да е по-висока (напр. 5 mg/ml), при липсата на достатъчна цитотоксичност, за да се увеличи концентрацията на всеки от компонентите. Следва да се отбележи обаче, че тези изисквания могат да се различават по отношение на фармацевтични продукти за хуманна употреба (42).

Контроли

23. Паралелни отрицателните контроли (вж. точка 16), състоящи се само от разтворител в средата за третиране, с които се борава по същия начин като културите, които се третират, следва да се включат за всяко експериментално условие.
24. Паралелни положителни контроли са необходими за доказване на способността на лабораторията за идентифициране на мутагени при условията на използвания протокол за изпитването и на ефективността на екзогенната система за метаболитно активиране, когато е приложимо. Примери за положителни контроли са дадени в таблица 1 по-долу. Могат да бъдат използвани алтернативни вещества за положителни контроли, ако това е обосновано. Тъй като *in vitro* изпитванията за генетична токсичност върху клетки от бозайници са достатъчно стандартизирани, изпитванията с третиране със и без екзогенно метаболитно активиране могат да се извършват като се използва само положителна контрола, която изисква метаболитно активиране. В този случай откликът на тази положителна контрола без повторение ще докаже както активността на дадена система за метаболитно активиране, така и способността на изпитваната система за генериране на отклик. Всяка положителна контрола следва да се използва при една или повече концентрации, които се очаква да породят възпроизводими и откриваеми увеличения спрямо фона, за да се докаже чувствителността на системата за изпитване, и откликът не трябва да се излага на риск от цитотоксичност, надхвърляща границите, определени в настоящия метод за изпитване (вж. точка 20).

Таблица 1: Препоръчителни референтни вещества за оценка на пригодността на лабораторията и за подбор на положителни контроли.

Метаболитно активиране	Локус	Вещество и CAS №
Отсъствие на екзогенно метаболитно активиране	<i>Hprt</i>	Етилметансулфонат [CAS № 62-50-0] Етилнитрозоуреа [CAS № 759-73-9] 4-Нитрохинолин-1-оксид [CAS № 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Стрептонигрин [CAS № 3930-19-6] Митомицин C (CASRN 50-07-7)
Наличие на екзогенно	<i>Hprt</i>	3-Метилхолантрен [CAS № 56-49-5]

метаболично активиране		7,12-Диметилбензантрацен [CAS № 57-97-6] Бензо[<i>a</i>]пирен (CAS № 50-32-8)
	<i>xprt</i>	Бензо[<i>a</i>]пирен (CAS № 50-32-8)

ПРОЦЕДУРА

Третиране с изпитвания химикал

25. Пролифериращите клетки се третират с изпитвания химикал при наличието и в отсъствието на система за метаболично активиране. Експозицията следва да е за подходящ период от време (обикновено 3—6 часа е достатъчно).
26. Минималният брой клетки, използвани за всяка изпитвана (контролна и третирана) култура на всеки етап от изпитването, следва да се базира на честотата на спонтанните мутации. Като обща насока, трябва при третиранията и пасажите клетките да са достатъчно, за да се поддържат 10 спонтанни мутанти във всяка култура във всички фази от изпитването (17). Честотата на спонтанните мутации като цяло е между 5 и 20×10^{-6} . За честота на спонтанни мутации 5×10^{-6} и за поддържане на достатъчен брой спонтанни мутанти (10 или повече) дори за културите, третирани при концентрации, които причиняват 90 % цитотоксичност по време на третирането (10 % RS), би било необходимо да се третират най-малко 20×10^6 клетки. Освен това достатъчен брой клетки (но не по-малко от 2 милиона) трябва да бъдат култивирани по време на периода на експресия и да бъдат посетени за избор на мутант (17).

Време на фенотипно изразяване и измерване на честотата на мутантите

27. След периода на третиране клетките се култивират, за да се даде възможност за експресия на мутантния фенотип. Обикновено е достатъчен минимум от 7 до 9 дни, за да се даде възможност за почти оптимална фенотипна експресия на новоиндуцирани *Hprt* и *xprt* мутанти (43) (44). През този период се правят редовно субкултури, за да се поддържат клетките в експоненциален растеж. След фенотипната експресия клетките се препосяват в среда със и без селективен агент (6-тиогуанин), за да се определи съответно броят на мутантите и ефикасността на клониране по време на подбора. Това посяване може да се извърши, като се използват блюда за монослойни култури или микроямкови плаки за клетки в суспензия. За подбора на мутантите клетките следва да се посяват при гъстота, осигуряваща оптимално възстановяване на мутантите (т.е. при избягване на метаболично взаимодействие) (17). Блюдата се инкубират за период от време, който е подходящ за оптималния растеж на колонии (напр. 7—12 дни) и брой колонии. Честотата на мутантите се изчислява въз основа на броя на мутантните колонии, коригиран с ефикасността на клониране към момента на подбора на мутантите (вж. допълнение 2 за формули).

Пригодност на лабораторията

28. За да се натрупа достатъчно опит по отношение на изпитването преди използването му за рутинно изпитване, лабораторията следва да е извършила поредица опити с положителни референтни вещества, действащи чрез различни механизми (най-малко по едно със и едно без метаболитно активиране, избрани от веществата, изброени в таблица 1) и различни отрицателни контроли (с използване на различни разтворители/носители). Положителният и отрицателният отклик при тези контроли следва да съответства на литературните източници. Това не се прилага за лаборатории, които разполагат с опит, т.е. които разполагат с налична база данни за предходни периоди, както е определено в точки 30—33.
29. Изборът на вещества за положителни контроли (вж. таблица 1 в точка 25) следва да се изследва при отсъствие и при наличие на метаболитно активиране, за да се докаже пригодността за откриване на мутагенни химикали, да се определи ефективността на системата за метаболитно активиране и да се докаже целесъобразността на условията за растеж на клетките по време на третирането, фенотипната експресия и избора на мутанти, и на процедурите за оценяване. Следва да бъде избран обхват от концентрации на веществата от подбора така, че да се получават възпроизводими и свързани с концентрацията увеличения над фоновите стойности с цел да се демонстрират чувствителността и динамичният обхват на системата за изпитване.

Данни за контролите за предходни периоди

30. Лабораторията следва да установи:
- Размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди,
 - Размах и разпределение при отрицателните (без третиране и за разтворител) контроли от предходни периоди.
31. При първото придобиване на данни за разпределението при отрицателните контроли от предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да бъдат съобразени с публикуваните данни за контролите (22). При добавяне на повече опитни данни към разпределението при контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % на това разпределение (17) (45) (46).
32. Базата данни с отрицателни контроли от предходни периоди на лабораторията следва първоначално да се създаде с минимум 10 опита, но е за предпочитане тя да се състои най-малко от 20 опита, проведени при сравними опитни условия. Лабораториите трябва да използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (X-bar) (47)), за определяне на варирането на данните им за положителните и отрицателните контроли, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории

(46). В литературата (45) могат да се намерят допълнителни препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит).

33. Данните за отрицателните контроли следва да се състоят от честоти на мутантите от култури без повторение или — за предпочитане — с повторения, както е описано в точка 23. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди (17) (45) (46). Когато данните за паралелните отрицателни контроли попадат извън 95 %-ната граница за контрол, те могат да бъдат приемливи за включване в разпределението при контролите от предходни периоди, при условие че тези данни не са екстремални стойности, силно различаващи се от нормалните, и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. по-горе), както и доказателства за липса на техническа или човешка грешка.
34. Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на тяхната съгласуваност със съществуващите бази данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди. Всички значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Представяне на резултатите

35. Представянето на резултатите следва да включва всички данни, необходими за изчисляване на цитотоксичността (като RS). Данните както за третираните, така и за контролните култури, следва да включват броя на клетките в края на третирането, броя на клетките, посети непосредствено след третирането, както и броят на колонии (или броят на ямките без колонии за микроямковия метод). RS за всяка култура следва да се изразява като процент спрямо паралелната контрола на разтворител (виж допълнение 1 за определения).
36. Представянето на резултатите следва също да включва всички данни, необходими за изчисляване на честотата на мутантите. Данните както за третираните, така и за контролните култури, следва да включват: 1) броят на клетките, посети със и без селективен агент (в момента, в който клетките са посети за подбора на мутанти) и 2) броят на преброените колонии (или броят на ямките без колонии за микроямковия метод) от блюдата със и без селективен агент. Честотата на мутантите се изчислява въз основа на броя на мутантните колонии (в блюдата със селективен агент), коригиран с ефикасността на клониране (от блюдата без селективен агент).

Честотата на мутантите следва да бъде изразена като брой мутантни клетки на един милион жизнеспособни клетки (вж. допълнение 1 за определения).

37. Следва да се предоставят данни за отделните култури. В допълнение към това всички данни следва да бъдат обобщени в табличен вид.

Критерии за приемливост

38. Приемливостта на дадено изпитване се основава на следните критерии:

- Паралелната отрицателна контрола се счита за приемлива за допълване към базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди, както е описано в точка 33.
- Паралелните положителни контроли (вж. точка 24) трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола.
- Две опитни условия (т.е. със и без метаболитно активиране) са били изследвани, освен ако едно от тях не е довело до положителни резултати (вж. точка 25).
- Достатъчен брой клетки и концентрации са годни за анализ (точки 25, 26 и 19).
- Критериите за избор на най-високата концентрация са съвместими с описаните в точки 20, 21 и 22.

Оценка и тълкуване на резултатите

39. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако в някое от изследваните опитни условия:

- при най-малко една от изпитваните концентрации се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- увеличението е свързано с концентрацията при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- някой от тези резултати е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Пуасон с граница за контрол 95 %). вж. точка 33).

Ако са изпълнени всички тези критерии се смята, че изпитваният химикал може да предизвика генни мутации в култивирани клетки от бозайници в тази система за изпитване. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (46) (48).

40. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия:

- в никоя от изпитваните концентрации не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- няма увеличение, свързано с концентрацията при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граница за контрол 95 %); вж. точка 33).

Тогава се смята, че изпитваният химикал не може да предизвика генни мутации в култивирани клетки от бозайници в тази система за изпитване.

41. Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.
42. В случаите, когато откликът не е нито ясно отрицателен, нито ясно положителен, както е описано по-горе, или с цел подпомагане на установяването на биологичната относимост на даден резултат, данните следва да се оценяват чрез експертна оценка и/или чрез допълнителни изследвания. Извършването на опит с повторение с възможност за използване на изменени опитни условия [напр. интервал на разполагане на концентрациите, други условия на метаболитно активиране (т.е. концентрация на S9 или производ на S9)] може да се окаже полезно.
43. В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати. Поради това за отклика на изпитвания химикал следва да се заключи, че е неясен (тълкуван като еднакво вероятно да е положителен или отрицателен).

Протокол от изпитването

44. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;

- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител:

- обосновка на избора на разтворител;
- процентно съдържание на разтворителя в окончателната среда за отглеждане.

Клетки:

За първични култури в лабораторията:

- тип, източник на клетъчните линии;
- брой пасаж, при наличност, и история в лабораторията;
- кариотипни характеристики и/или модален брой на хромозомите;
- методи за поддържане на клетъчните култури;
- отсъствие на микоплазма;
- времена за удвояване на клетките.

Условия на изпитването:

- обосновка за избора на концентрациите и броя на културите, в т.ч. напр. данни за цитотоксичността и ограничения, свързани с разтворимостта;
- състав на средите, концентрация на CO₂, влажност;
- концентрация на изпитвания химикал, изразена като крайна концентрация в средата за отглеждане (напр. µg или mg/ml или mM от среда за отглеждане);
- концентрация (и/или обем) на разтворителя и изпитвания химикал, добавени в средата за отглеждане;
- температура на инкубиране;
- време на инкубиране;
- времетраене на третирането;
- гъстота на клетките по време на третиране;

- тип и състав на системата за метаболитно активиране (източник на S9, метод на приготвяне на S9 микс, концентрация или обем на S9 микс и S9 в окончателната среда за отглеждане, контрол на качеството на S9);
- вещества за положителни и за отрицателни контроли, крайни концентрации за всяко условие на третиране;
- продължителност на периода на експресия (в т.ч. брой на посетите клетки и субкултури и графици на подхранване, ако е уместно);
- идентификационни данни на селективния агент и неговата концентрация;
- критерии за приемливост на изпитванията;
- използвани методи за преброяване на жизнеспособните и мутиралите клетки;
- Методи, използвани за измерване на цитотоксичността;
- всякаква допълнителна информация, относима към цитотоксичността и използвания метод;
- продължителност на инкубационните периоди след посяване;
- критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или неясни;
- методи, използвани за определяне на рН, осмолалитета и утайката.

Резултати:

- брой на третираните клетки и брой на клетките, подложени на субкултура за всяка култура;
- измервания на цитотоксичността и други наблюдения, ако има такива;
- признаци на утаяване и час на определяне;
- броят клетки, посети в среда със селективен агент и в среда без селективен агент;
- брой на колонии в среда без селективен агент и брой на резистентни колонии в среда със селективен агент, и свързани честоти на мутантите;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- данни от паралелни отрицателни (разтворител) и положителни контроли (концентрации и разтворители);
- данни за отрицателни (разтворител) и положителни контроли за предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартни отклонения и доверителен интервал (напр. 95 %), както и брой на данните;
- статистически анализи (за индивидуални култури и обединени повторения, ако е целесъобразно) и р-стойности, ако има такива.

Обсъждане на резултатите.

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Мутагени, предизвикващи заместване на двойка бази: химикали, предизвикващи заместване на двойка бази в ДНК.

Химикал: Вещество или смес.

Ефикасност на клониране: Процентът на клетките, посети с ниска гъстота, които са в състояние да растат в колония, която може да бъде преброена.

Концентрации: отнася се за крайните концентрации на изпитвания химикал в средата за отглеждане.

Цитотоксичност: За изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, цитотоксичността се определя като намаляване на относителната преживяемост на третираните клетки в сравнение с отрицателната контрола (вж. конкретната точка).

Права мутация: генна мутация от родителския тип в мутанта, от която възниква изменение или загуба на ензимна активност или на функцията на кодируния белтък.

Мутагени с изместване на рамката на разчитане: химикали, които причиняват добавяне или делеция на една или много двойки бази в молекулата на ДНК.

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждане на ДНК или хромозоми, включително разкъсвания на ДНК, адукти, пренареждания, мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички типове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.

НАТ среда: среда, съдържаща хипоксантин, аминоптерин и тимидин, използвана за почистване на Hprt мутанти.

Митотична рекомбинация: Рекомбинация, по време на митозата, между хомоложни хроматиди, евентуално водеща до индуциране на разкъсвания на двойната спирала на ДНК или до загуба на хетерозиготност.

МРА среда: среда, съдържаща ксантин, аденин, тимидин, аминоптерин и микофенолова киселина, използвани за почистване на Xprt мутанти.

Мутагенен: води до наследствена промяна на ДНК последователност(и) на базовите двойки в гени, или на структурата на хромозоми (хромозомни аберации).

Честотата на мутантите (MF): броят на наблюдаваните мутантни колонии, разделен на броя клетки, посети в селективна среда, коригиран с оглед на ефикасността на клониране (или жизнеспособността) към момента на подбора.

Време на фенотипна експресия: Времето след третирането, през което генетичното

изменение се фиксира в генома, и всички съществуващи преди това генетични продукти се изчерпват до момента, в който фенотипният признак се променя.

Относителна преживяемост (RS): RS се използва като мярка за свързана с третирането цитотоксичност. RS е ефикасността на клониране (CE) на клетки, които са посетили непосредствено след третирането, с корекция за всякаква загуба на клетки по време на третирането, в сравнение с ефикасността на клониране в отрицателни контроли (на които е присвоена стойност 100 % за преживяемостта).

S9 фракции от черен дроб: супернатант от хомогенат на черен дроб след центрофугиране при 9000g, т.е. необработен екстракт от черен дроб.

S9 микс: микс от S9 фракцията от черен дроб и кофактори, необходими за метаболитна ензимна активност.

Контрола на разтворител: общ термин за определяне на контролните култури, които са само на разтворителя, който се използва за разтваряне на изпитвания химикал.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Нетретирана контрола: култури, които не се третират (т.е. без изпитвания химикал и без разтворител), но се обработват паралелно и по същия начин като културите, които се третират с изпитвания химикал.

UVCB: Химични вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции и биологични материали.

Допълнение 2

ФОРМУЛИ ЗА ОЦЕНКА НА ЧЕСТОТАТА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И НА ЧЕСТОТАТА НА МУТАНТИТЕ

Цитотоксичността се оценява чрез относителната преживяемост, т.е. ефикасността на клониране (CE), на клетките, посети непосредствено след третирането, и коригирана за всяка загуба на клетка по време на третирането, в сравнение с коригираната ефикасност на клониране при отрицателните контроли (на които е присвоена стойност 100 % за преживяемостта) (вж. по-долу формулата за RS).

Коригираната CE за култура, третирана с изпитван химикал, се изчислява като:

$$\text{Adjusted CE} = \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS за култура, третирана с изпитван химикал, се изчислява като:

$$\text{RS} = \frac{\text{Adjusted CE in treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Честотата на мутантите е ефикасността на клониране на мутантни колонии в селективна среда, разделена на ефикасността на клониране в неселективна среда, измерена за същата култура в момента на подбора.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Cloning efficiency of mutant colonies in selective medium}}{\text{Cloning efficiency in non – selective medium}}$$

Когато за ефикасността на клониране се използват блюда:

CE = Брой колонии/брой на посетите клетки.

Когато за ефикасността на клониране се използват микроямкови блюда:

Броят на колониите на ямка в микроямковите блюда следва разпределение на Поасон.

Ефикасност на клониране = $-\text{LnP}(0)$ /брой на посетите клетки в ямка

Където $-\text{LnP}(0)$ е вероятният брой празни ямки от посетите ямки, и се описва по следната формула:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{брой празни ямки}/\text{брой посети ямки})$

3) В Част Б глава Б.22 се заменя със следното:

„Б.22 ИЗПИТВАНЕ ЗА ДОМИНАНТНИ ЛЕТАЛИ ПРИ ГРИЗАЧИ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване (МИ) е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП 478 (2016 г.). Методите за изпитване периодично се преразглеждат в светлината на научния прогрес, променящите се регулаторни нужди и съображенията за хуманно отношение към животните. Тази модифицирана версия на метода за изпитване отразява повече от тридесет години опит с това изпитване и потенциала за интегриране или съчетаване на това изпитване с други изпитвания за токсичност, като изследвания за развиващия се организъм, за токсичност за репродукцията или за генотоксичност; независимо от това поради ограниченията му и използването на голям брой животни това изследване не е предназначено за употреба като основен метод, а по-скоро като допълнителен метод за изпитване, който може да се използва само когато няма алтернатива за регулаторните изисквания. Съчетаването на изпитванията за токсичност има потенциала да предотврати използването на голям брой животни в изпитвания за токсичност. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на последните промени, направени в насоките за изпитване на ОИСП за генетична токсичност (1).
2. Целта на изпитването за доминантни летали (ДЛ) е да се проучи дали химикалите предизвикват мутации, получени в резултат на хромозомни аберации в зародишни клетки. В допълнение изпитването за доминантни летали е относимо към оценката на генотоксичността, тъй като, въпреки че могат да варират според животинския вид, факторите за метаболизма *in vivo*, фармакокинетиката и процесите на поправка на ДНК са активни и допринасят за отклика. Индуцирането на мутация на ДЛ след експозиция на изпитван химикал показва, че химикалът е засегнал зародишни тъкани от изпитваното животно.
3. Мутациите на ДЛ причиняват смърт на ембриона или фетуса. Индуцирането на мутация на ДЛ след експозиция на изпитван химикал показва, че химикалът е засегнал зародишните клетки на изпитваното животно.
4. Изпитването за ДЛ е полезно за потвърждаване на положителни резултати от изпитвания със соматични *in vivo* крайни точки и е крайна точка, относима към прогнозирането на опасност за човека и на риск от генетични заболявания, предавани през зародишната линия. Това изследване обаче изисква голям брой животни и е трудоемко; в резултат на това извършването му е много скъпо и отнемащо време. Тъй като спонтанната честота на мутациите на ДЛ е доста висока,

чувствителността на изследването за откриване на малки увеличения в честотата на мутациите обикновено е ограничена.

5. Определенията на ключови термини са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

6. Изпитването се провежда най-често с мишки (2) (3) (4), но в някои случаи могат да бъдат подходящи други видове, като плъхове (5) (6) (7) (8), ако е научно обосновано. ДЛ обикновено са резултат от груби хромозомни аберации (структурни и числови аномалии) (9) (10) (11), но не могат да бъдат изключени генни мутации. Мутацията на ДЛ е мутация, която сама по себе си възниква в зародишни клетки, или е фиксирана след оплождането в ранния ембрион, която не причинява дисфункция на гаметата, но е летална за оплодената яйцеклетка или за развиващия се ембрион.
7. Отделните мъжки индивиди се чифтосват последователно с девствени женски животни на подходящи интервали. Броят на чифтосванията след третирането зависи от крайната цел на изследването на ДЛ (параграф 23) и следва да гарантира, че всички фази на съзряването на мъжките зародишни клетки са оценени за ДЛ (12).
8. Ако има доказателства, че изпитваният химикал или негов метаболит (или метаболити) няма да достигне до тестисите, не е целесъобразно да се използва това изпитване.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

9. Като цяло мъжките животни се подлагат на експозиция на изпитван химикал чрез подходящ път на експозиция и се чифтосват с нетретирани девствени женски индивиди. Различните типове зародишни клетки могат да бъдат изпитвани чрез използване на последователни интервали на чифтосване. След чифтосването женските животни се подлагат на евтаназия след подходящ период от време, и матките им се изследват, за да се определи броят на имплантатите и живите и мъртвите ембриони. Доминантната леталност на даден изпитван химикал се определя чрез сравняване на живите имплантати за женски индивид в третираната група с живите имплантати за женски индивид в контролната група на носител/разтворител. Нарастването на броя на мъртвите имплантати за женски индивид в третираната група в сравнение с броя на мъртвите имплантати за женски индивид в контролната група отразява постимплантационната загуба, индуцирана от изпитвания химикал. Постимплантационната загуба се изчислява, като се определя съотношението на мъртвите към общия брой имплантати в третираната група в сравнение със съотношението на мъртвите към общия брой на имплантатите в контролната група. Предимплантационната загуба може да бъде оценена въз основа

на броя на жълтите тела минус общия брой имплантати или чрез сравняване на общия брой имплантати за женски индивид в третираната и контролната група.

ПРОВЕРКА НА ПРИГОДНОСТТА НА ЛАБОРАТОРИЯТА

10. Компетентността за това изследване следва да се установи, като се демонстрира способността за възпроизвеждане на честотите на ДЛ от публикуваните данни (напр. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) с вещества за положителни контроли (включително слаби отклици), като например изброените в таблица 1, и контроли на разтворител, и получаване на честоти при отрицателни контроли, които представляват съгласуван приемлив набор от данни (вж. посочените по-горе референтни източници) или с разпределението на контролите от предходни периоди на дадената лаборатория, ако има такова.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Подготовка

Избор на животински вид

11. Следва да се използват обичайно използвани в лабораториите породи от здрави полово зрели животни. Обичайно се използват мишки, но плъховете могат също да бъдат подходящи. Всеки друг подходящ вид бозайници може да се използва, ако е предоставена научна обосновка в протокола.

Условия на отглеждане и хранене на животните

12. За гризачи в помещението, в което се намират животните, температурата следва да е 22 °C (± 3 °C). Въпреки че в идеалния случай относителната влажност следва да бъде 50—60 %, тя трябва да е поне 40 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по този път. Преди третирането или чифтосването, гризачите следва да бъдат настанени в малки групи (не повече от пет) от същия пол, ако не се очаква или наблюдава агресивно поведение, за предпочитане в здрави клетки с подходящо облагородяване на жизнената среда. Животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано.

Подготовка на опитните животни

13. Здрави и полово зрели мъжки и женски животни се определят на произволен принцип за контролните групи и групите за третиране. Отделните животни се

идентифицират индивидуално единствено чрез хуманни, минимално инвазивни методи (напр. чрез опръстеняване, поставяне на марка, микрочип или биометрична идентификация, но не и чрез изрязване на уши или пръсти) и се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Кръстосаното замърсяване с положителната контрола и с изпитвания химикал следва да се избягва. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло на всеки пол.

Приготвяне на дозите

14. Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение и посочват подходящите условия за съхранение.

Условия на изпитване

Разтворител/носител

15. Разтворителят/носителят не следва да има токсични ефекти при използването обема на доза, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и изпитвания химикал. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се винаги, когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител. Примери за обичайно използвани съвместими разтворители/носители са водата, физиологичният разтвор, разтворът на метилцелулоза, разтворът на натриевата сол на карбоксиметилцелулозата, маслиновото масло и царевичното масло.

Положителни контроли

16. Винаги следва да се използват паралелни положителни контролни животни, освен ако лабораторията е доказала пригодността си за провеждане на изпитването и е използвала рутинно изпитването в близкото минало (например през последните 5 години). Не е необходимо обаче да се третират животните от положителните контроли по същия път като животните, които получават изпитвания химикал, или да се вземат проби през всички интервали на чифтосване. За веществата за положителни контроли следва да се знае, че водят до ДЛ при условията, използвани

при изпитването. С изключение на самото третиране, с животните в контролните групи следва да се борава по същия начин като с тези от групите за изпитване.

17. Дозите на веществата за положителни контроли следва да бъдат избрани така, че да предизвикват слаби или умерени ефекти, които критично оценяват действието и чувствителността на изследването, но които постоянно дават положителни ДЛ ефекти. Примери за вещества за положителни контроли са включени в таблица 1.

Таблица 1: Примери за вещества за положителни контроли.

Вещество (CAS №) (Референтен №)	Диапазон на ефективната доза (mg/kg) (видове гризачи)	Време на прилагане (дни)
Триетиленмеламин [51-18-3] (15)	0,25 (мишки)	1
Циклофосфамид [50-18-0] (19)	50-150 (мишки)	5
Циклофосфамид [50-18-0] (5)	25-100 (плъхове)	1
Етилов метансулфонат [62-50-0] (13)	100-300 (мишки)	5
Мономерен акриламид [79-06-1] (17)	50 (мишки)	5
Хлорамбуцил [305-03-3] (14)	25 (мишки)	1

Отрицателни контроли

18. Животни от отрицателни контроли, третирани само с разтворител или носител, и с които в друго отношение се борава по същия начин като третираните групи, следва да се включат за всеки момент на пробовземане (20). При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният разтворител/носител не предизвиква никакви ДЛ или други неблагоприятни ефекти, за всеки момент на пробовземане следва да бъдат включени и животни от нетретирани контроли, за да се установи приемливостта на контролата на носител.

ПРОЦЕДУРА

Брой на животните

19. Отделните мъжки индивиди се чифтосват последователно на подходящи предварително определени интервали (напр. седмични интервали, точки 21 и 23), за предпочитане само с една девствена женска. Броят на мъжките индивиди на група следва да бъде предварително определен като достатъчен (в комбинация с броя на

чифтосаните женски индивиди за всеки интервал на чифтосване), за да се осигури статистическата мощност, необходима за откриване най-малко на удвояване на честотата на ДЛ (точка 44).

20. Броят на женските на интервал за чифтосване трябва също така да се предопределя от изчисленията на статистическата мощност така, че да се позволи откриването на поне удвояване в честотата на ДЛ (т.е. достатъчно на брой бременни женски индивиди за осигуряване на общо поне 400 имплантати) (20) (21) (22) (23) и да се очаква поне един мъртъв имплантат на аналитична единица (т.е. група за чифтосване за доза) (24).

Период на прилагане и интервали на чифтосване

21. Броят на интервалите на чифтосване след третирането се регулира от графика на третиране и следва да гарантира, че всички фази на периода на узряване на мъжките зародишни клетки се оценяват за индуциране на ДЛ (12) (25). За еднократно третиране до пет прилагания на дози дневно, следва да има 8 (мишки) или 10 (плъхове) чифтосвания на седмични интервали след последното третиране. За прилагане на множество дози броят на интервалите на чифтосване може да бъде намален пропорционално на увеличената продължителност на периода на прилагане, но като се поддържа целта за оценяване на всички фази на сперматогенезата (например след 28-дневна експозиция са достатъчни само 4 седмични чифтосвания за оценка на всички фази на сперматогенезата на мишката). Всички графици за третиране и чифтосване следва да бъдат научно обосновани.
22. Женските индивиди следва да останат при мъжките най-малко за времетраенето на един естрален цикъл (напр. една седмица обхваща един естрален цикъл и при мишките, и при плъховете). Женските животни, които не са се чифтосали в интервал от една седмица, могат да бъдат използвани за следващ интервал на чифтосване. Алтернативно, до настъпването на чифтосването, както е определено от наличието на сперма във влагалището или от наличието на вагинална запушалка.
23. Използваният режим на експозиция и на чифтосване зависи от крайната цел на изследването на ДЛ. Ако целта е да се определи дали даден химикал индуцира мутации на ДЛ *сам по себе си*, тогава възприет метод би бил експозиция на целия цикъл на сперматогенезата (напр. 7 седмици при мишки, 5—7 третирания на седмица) и чифтосване веднъж в края. Ако обаче целта е да се идентифицира чувствителният тип зародишни клетки за индуциране на ДЛ, тогава за предпочитане е еднократна или 5-дневна експозиция, последвана от седмично чифтосване.

Нива на доза

24. Ако се извършва предварително изследване за определяне на обхвата, поради това че към съответния момент няма подходящи данни, които да подпомогнат избора на

доза, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същият вид, порода, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване (26). С проучването следва да се направи опит да се установи максималната допустима доза (МДД), определена като най-високата доза, която ще се толерира без доказателства за ограничаваща изследването токсичност спрямо продължителността на периода на изследването (например неестествено поведение или реакции, подтискане на телесното тегло или цитотоксичност за хемопоезичната система, но без смърт или доказателства за болка, страдание или дистрес, които изискват умъртвяване по хуманен начин (27).

25. МДД също така не трябва да влияе неблагоприятно на успеха на чифтосването (21).
26. Изпитвани химикали със специфична биологична активност при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) и химикали, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай.
27. С цел получаване на информация за дозата и отклика дадено пълно проучване следва да включва отрицателна контролна група и най-малко три нива на доза, обикновено разделени с кратност 2, но не по-голяма от 4. Ако изпитваният химикал не предизвиква токсичност в изследването за определяне на обхвата или въз основа на съществуващите данни, най-високата доза за отделно прилагане следва да бъде 2000 mg/kg телесно тегло. Ако обаче изпитваният химикал предизвиква токсичност, МДД следва да бъде най-високата приложена доза и използваните нива на доза следва да са в обхват от максималната доза до доза, която, предизвиква слаба токсичност или не е токсична. За химикали, които не са токсични, пределната доза за период на прилагане от 14 дни или повече е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, а за периоди на прилагане от по-малко от 14 дни пределната доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден.

Прилагане на дозите

28. При планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Поради това като обосновани могат да бъдат избрани например пътища на експозиция като хранителен режим, питейна вода, подкожно, интравенозно, локално, инхалаторно, орално (през сонда) или имплантация. Във всички случаи пътът следва да се избере така, че да осигури достатъчна експозиция на прицелната тъкан (или тъкани). Интраперитонеалното инжектиране обикновено не се препоръчва, тъй като то не е очакван път на експозиция на човека, и следва да бъде използвано само със специална научна обосновка. Ако изпитваният химикал се смеси в хранителния режим или в питейната вода, по-специално в случай на еднократно дозиране, следва да се положи грижа закъснението между консумацията на храна и вода и чифтосването да е достатъчно, за да позволи откриването на ефектите (точка 31). Максималният обем течност, който може да се приложи

еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът обичайно не следва да превишава 1 ml на 100 g телесно тегло, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, при които могат да бъдат използвани 2 ml на 100 g телесно тегло. Обеми, по-високи от този (ако това е позволено от законодателството за хуманно отношение към животните), следва да се обосноват. Варирането на обема на изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията, за да се осигури постоянен обем спрямо телесното тегло при всички нива на доза.

Наблюдения

29. Общи клинични наблюдения върху изпитваните животни следва да бъдат извършвани поне един път дневно и клиничните признаци следва да бъдат записвани, за предпочитане по едно и също време (или времена) веднъж дневно и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. По време на периода на дозиране всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност поне два пъти дневно. Теглото на всички животни следва да се измерва при започването на изследването и поне един път в седмицата по време на изследвания с повтаряща се доза, и при умъртвяването. Консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животни, проявяващи нелетални признаци на прекалена токсичност, следва да се умъртвят преди приключването на периода на изпитване (27).

Събиране и обработка на тъкани

30. Женските животни се умъртвяват през втората половина от бременността в ден на бременността (GD) 13 за мишки и GD 14—15 за плъхове. Матките се изследват за ДЛ ефекти, за да се определи броят на имплантатите, живите и мъртвите ембриони и жълтите тела.
31. Рогът на матката и яйчниците се разкриват за преброяване на жълтите тела и фетусите се отстраняват, преброяват се и се претеглят. Следва да се вземат мерки за изследване на матките за резорбции, скрити от живи фетуси, и за гарантиране, че са изброени всички резорбции. Феталната смъртност се записва. Записват се също и броят на успешно импрегнираните женски животни и броят на всички имплантации, предимплантационните загуби и смъртността след имплантирането (включително ранна и късна резорбция). Освен това видимите фетуси могат да бъдат съхранени във фиксатор на Bouin в продължение на най-малко 2 седмици, след което трябва да се направи изследване на основните външни малформации (28), за да се предостави допълнителна информация относно ефектите върху репродукцията и развиващия се организъм на изпитваното средство.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

32. Данните следва да бъдат представени в табличен вид, за да покажат броя на чифтосаните мъжки индивиди, броя на бременните женски и броя на женските животни, които не са бременни. Поотделно следва да се отчетат резултатите от всяко чифтосване, включително идентичността на всеки мъжки и женски индивид. За всяко женско животно следва да бъде посочен интервалът на чифтосването, нивото на дозата за третираните мъжки и броят на живите импланти и мъртвите импланти.
33. Постимплантационната загуба се изчислява, като се определя съотношението на мъртвите към общия брой импланти в третираната група в сравнение със съотношението на мъртвите към общия брой на имплантите в контролната група на носител/разтворител.
34. Предимплантационната загуба се изчислява като разликата между броя на жълтите тела и броя на имплантите или като намаляване на средния брой импланти за женски индивид в сравнение с контролните чифтосвания. Когато се оценява предимплантационната загуба, тя следва да бъде протоколирана.
35. Прогнозна оценка на коефициента на ДЛ се прави по следния начин: (смъртни случаи след имплантацията/общ брой имплантации на женски индивид) x 100.
36. Трябва да бъдат протоколирани данните за токсичност и клиничните признаци (както е посочено в точка 29).

Критерии за приемливост

37. Следните критерии определят приемливостта на дадено изпитване.
 - Паралелната отрицателна контрола е в съответствие с публикуваните норми за данните за отрицателните контроли от предходни периоди, както и с данните за контролите от предходни периоди на лабораторията, ако има такива (вж. точки 10 и 18).
 - Паралелни положителни контроли предизвикват отклици, които са в съответствие с публикуваните норми за данни от положителни контроли от предходни периоди, или с базата данни на дадената лаборатория за положителни контроли за предходни периоди, ако са налични, и предизвикват статистически значимо увеличение в сравнение с отрицателната контрола (вж. точки 17 и 18).
 - Анализирани са достатъчен общ брой импланти и дози (точка 20).
 - Критериите за избор на най-високата доза съответстват на описаните в точки 24 и 27.

Оценяване и тълкуване на резултатите

38. Най-малко три третирани с определена доза групи трябва да бъдат анализирани, за да бъдат получени достатъчно данни за анализ доза-отговор.

39. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако:

- при най-малко една от изпитваните дози се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола;
- увеличението е свързано с дозата в поне едно експериментално условие (напр. седмичен интервал на чифтосване), когато се оценява с подходящ тест; както и
- някой от резултатите е извън допустимия размах за данните от отрицателните контроли, или разпределението на данните на лабораторията за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. разпределение на Поасон с граница на контрол 95 %), ако е на разположение.

След това се счита, че изпитваният химикал е в състояние да предизвика мутации на ДЛ в зародишните клетки на изпитваните животни. Препоръки за най-подходящите статистически методи са описани в точка 44; други препоръчани статистически подходи могат да бъдат намерени в литературата (20) (21) (22) (24) (29). При използваните статистически тестове за опитна единица следва да се счита животното.

40. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако:

- в никоя от изпитваните дози не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола;
- няма свързано с дозата увеличение в нито едно от опитните условия; както и
- всички резултати са извън допустимия размах за данните от отрицателните контроли, или данните на лабораторията за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. разпределение на Поасон с граница на контрол 95 %), ако е на разположение.

След това се счита, че изпитваният химикал не е в състояние да предизвика мутации на ДЛ в зародишните клетки на изпитваните животни.

41. Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

42. Ако откликът не е ясно отрицателен или положителен, и с цел да се подпомогне установяването на биологичната относимост на даден резултат (например слабо или гранично увеличение), данните следва да бъдат оценени чрез експертна оценка и/или допълнителни проучвания, като се използват съществуващите опитни данни, като например разглеждане дали положителният резултат е извън допустимия размах на данните за отрицателните контроли, или данните за отрицателните контроли за предходни периоди за дадената лаборатория (30).
43. В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати и следователно се заключава, че е неясен.
44. При използваните статистически тестове за опитна единица следва да се счита мъжкото животно. Въпреки че е възможно данните от преброяването (например брой на имплантатите на женски индивид) да са с разпределение на Поасон и/или пропорциите (напр. делът на мъртвите имплантати) може да са с биномно разпределение, често тези данни са със свръхдисперсия (31). Съответно статистическият анализ следва първо да приложи тест за разлики между дисперсията и средната стойност, при което се използват тестове, свързани с дисперсията, като например тестът на Кокрън за биномна дисперсия (32) или $S(\alpha)$ -тестът на Тарон за биномна свръхдисперсия (31) (33). Ако не се открие никакво отклонение от биномната дисперсия, трендовете в пропорциите между нивата на доза могат да бъдат тествани като се използва трендовият тест на Кокрън-Армитидж (34), а сравнения по двойки с контролната група могат да бъдат тествани с помощта на точен тест на Фишер (35). Също така, ако не бъде открито отклонение от Поасоновата дисперсия, трендовете при преброяванията могат да бъдат тествани с помощта на регресия по Поасон (36), а сравнения по двойки с контролната група могат да бъдат тествани в контекста на модела на Поасон, като се използват контрасти по двойки (36). Ако се открие значима разлика между дисперсията и средната стойност, се препоръчват непараметрични методи (23) (31). Те включват рангови тестове, като например трендовият тест на Йонкхере-Терпстра (37) и тестове на Ман-Уитни (38) за сравнения по двойки с контролната група на носител/разтворител, както и пермутация, повторна извадка или бутстрап тестове за тренд и сравнения по двойки с контролната група (31) (39).
45. Положителното изследване за ДЛ предоставя доказателство за генотоксичност на изпитвания химикал в зародишните клетки на третираните мъжки животни от изпитвания животински вид.
46. Проучването дали наблюдаваните стойности са в рамките на контролния обхват от предходни изследвания, или извън него, може да осигури насоки при оценката на биологичната значимост на отклика (40).

Протокол от изпитването

47. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация.

Резюме

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Приготвяне на химикала за изпитване:

- обосновка за избора на носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;
- приготвяне на формулировките за хранителен режим, питейна вода или инхалация;
- аналитични определяния, свързани с формулировките (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации), когато са извършвани такива.

Изпитвани животни:

- използван вид/порода и обосновка за избора;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- метод за еднозначно идентифициране на животните;

- за краткосрочни изследвания: индивидуално телесно тегло на мъжките индивиди в началото и в края на изпитването; за изследвания, по-дълги от една седмица: индивидуални телесни тегла по време на проучването и консумация на храна. Следва да бъдат включени размахът, средната стойност и стандартното отклонение при телесното тегло за всяка група.

Условия на изпитването:

- данни за положителните и отрицателните (носител/разтворител) контроли;
- данни от изследването за установяване на обхвата;
- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка на пътя на прилагане;
- методи за измерване на токсичността за животните, включително, когато е необходимо, хистопатологични или хематологични анализи и честота, с която са правени наблюдения върху животните или е измервано телесното тегло;
- методи за проверка дали изпитваният химикал е достигнал до прицелната тъкан, или до общото кръвообращение, ако са получени отрицателни резултати;
- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробности относно облагородяване на жизнената среда в клетката;
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;
- метод на аналгезия
- метод за умъртвяване;
- процедури за изолиране и съхраняване на тъкани;
- източник и номера на партиди за всички комплекти и реагенти (когато е приложимо);
- методи за изброяване на ДЛ;
- схема на чифтосване;
- използвани методи за определяне дали е осъществено чифтосване;
- време на умъртвяването;

- критерии за оценяване на ДЛ ефекти, включително жълти тела, имплантации, резорбции и предимплантационни загуби, живи имплантати, мъртви имплантати.

Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- телесно тегло на мъжкия индивид по време на периодите на третиране и чифтосване;
- брой на чифтосаните женски индивиди;
- взаимоотношение доза-отклик, където е възможно;
- паралелни данни от отрицателни контроли и данни от отрицателни контроли от предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартни отклонения;
- данни от паралелни положителни контроли;
- таблични данни за всеки женски индивид, включващи: брой на жълтите тела на женски индивид; брой на имплантациите на женски индивид; брой на резорбциите и предимплантационните загуби на женски индивид; брой на живите имплантати на женски индивид; брой на мъртвите имплантати на женски индивид; тегла на фетусите;
- горепосочените данни, обобщени за всеки период на чифтосване и доза, с честоти на ДЛ;
- статистически анализи и използвани методи.

Обсъждане на резултатите.

Заключение.

ЛИТЕРАТУРА

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химикал: Вещество или смес

Жълти тела: структура, отделяща хормони, образувана в яйчника на мястото на овулирал фоликул. Броят на жълтите тела в яйчниците съответства на броя на овулиралите яйцеклетки.

Мутация на доминантен летал: мутация, която се среща в зародишни клетки или е фиксирана след оплождането, причиняваща смърт на ембриона или фетуса.

Коефициент на плодовитост: броят на чифтосаните бременни женски индивиди, разделен на броя на чифтосаните женски индивиди.

Интервал на чифтосване: времето между края на експозицията и чифтосването на третираните мъжки индивиди. Чрез контролиране на този интервал могат да се оценят ефектите на химикала върху различни типове зародишни клетки. При чифтосване на мишки през 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 седмица след края на експозицията измерва ефектите по отношение на спермата, кондензираните сперматиди, кръглите сперматиди, пахитенните сперматоцити в пахитен, ранните сперматоцити, диференцираните сперматогонии, диференциращите се сперматогонии и сперматогониите стволони клетки.

Предимплантационна загуба: разликата между броя на имплантатите и броя на жълтите тела. Тя може също така да бъде оценена чрез сравняване на общия брой имплантати за женски индивид в третираните и контролните групи.

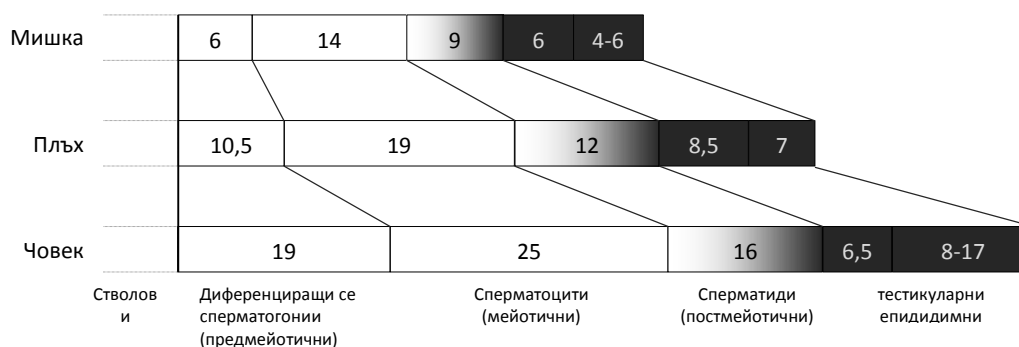
Постимплантационна загуба: съотношението на мъртвите към общия брой имплантати в третираната група в сравнение със съотношението на мъртвите към общия брой на имплантатите в контролната група.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

UVCB: Химично вещество с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции и биологични материали.

Допълнение 2

ГРАФИК НА СПЕРМАТОГЕНЕЗАТА ПРИ БОЗАЙНИЦИТЕ



Фиг. 1: Сравнение на продължителността (дни) на развитието на мъжките зародишни клетки при мишки, плъхове и хора. През периодите, отбелязани с фон, не се извършва поправка на ДНК.

По-горе е показана схема на сперматогенезата при мишки, плъхове и хора (взета от Adler, 1996 г.). Недиференцираните сперматогонии включват: А-единични (A-single); А-двойки (A-paired); и А-делящи се (A-aligned) сперматогонии (Hess and de Franca, 2008). А-единичните са смятани за същинските стволови клетки; поради това, за да се оцени въздействието върху стволовите клетки трябва да изминат най-малко 49 дни (при мишки) между последното инжектиране на изпитвания химикал и чифтосването.

Източници

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. B: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

4) В Част Б глава Б.23 се заменя със следното:

„Б.23 ИЗПИТВАНЕ ЗА СПЕРМАТОГОНИАЛНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване (МИ) е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП 483 (2016 г.). Методите за изпитване периодично се преразглеждат в светлината на научния прогрес, променящите се регулаторни нужди и съображенията за хуманно отношение към животните. Настоящата модифицирана версия на метода за изпитване отразява дългогодишния опит с това изследване и потенциала за неговото интегриране или съчетаване с други изследвания за токсичност или генотоксичност. Съчетаването на изследвания за токсичност има потенциала да намали броя на животните, използвани за изпитване на токсичността. Настоящият метод за изпитване е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на последните промени, направени в насоките за изпитване на ОИСП за генетична токсичност (1).
2. Целта на изпитването *in vivo* за сперматогониални хромозомни аберации при бозайници е да се идентифицират химикалите, които причиняват структурни хромозомни аберации в сперматогониалните клетки на бозайници (2) (3) (4). В допълнение това изпитване е относимо към оценката на генотоксичността, тъй като факторите за метаболизма *in vivo*, фармакокинетиката и репарационните процеси на ДНК са активни и допринасят за отклика, въпреки че могат да варират според животинския вид. Настоящият метод за изпитване не е предназначен за измерване на бройни аномалии; изследването не се използва редовно за тази цел.
3. Настоящото изпитване измерва структурните хромозомни аберации (от хромозомен и хроматиден тип) при деленето на сперматогониалните зародишни клетки и поради това се очаква да предсказва индуцирането на наследствени мутации в тези зародишни клетки.
4. Определенията на ключови термини са дадени в допълнението.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

5. В това изпитване обикновено се използват гризачи, но в някои случаи може да е подходящо да се работи с други видове, ако това е научно оправдано. Стандартните цитогенетични препарати от тестиси на гризач генерират митотични (сперматогонии) и мейотични (сперматоцити) метафази. Митотичните и мейотичните метафази се идентифицират въз основа на морфологията на хромозомите (4). Настоящото

цитогенетично изпитване *in vivo* открива структурни хромозомни аберации в сперматогониални митози. Други прицелни клетки не са обект на настоящия метод.

6. За да се открият аберации от хроматиден тип в сперматогониални клетки, следва да се изследва първото митотично клетъчно делене, преди тези аберации да се преобразуват в аберации от хромозомен тип в последващия процес на клетъчно делене. Допълнителна информация от третирани сперматоцити може да се получи чрез мейотичен хромозомен анализ за структурни аберации от хромозомен тип в диакинезисна метафаза I и метафаза II.
7. В тестиса (5) съществуват множество генерации сперматогонии, като тези различни видове стволови клетки може да са с различен спектър на чувствителност към химическо третиране. Така откритите аберации представляват съвкупната реакция на третираните популации сперматогониални клетки. Преобладаващата част от митотичните клетки в препаратите от тестиса са сперматогонии от тип Б, чийто клетъчен цикъл е приблизително 26 часа (3).
8. Ако има доказателства, че изпитваният химикал или негов метаболит (или метаболити) няма да достигне до тестисите, не е целесъобразно да се използва това изпитване.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

9. Като цяло, животните се излагат на изпитвания химикал по подходящ начин и се евтаназират в подходящи моменти след третирането. Преди евтаназията, животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или Колцемид®). След това се приготвят хромозомни препарати от зародишни клетки, оцветяват се и клетките в метафаза се анализират за хромозомни аберации.

ПРОВЕРКА НА ПРИГОДНОСТТА НА ЛАБОРАТОРИЯТА

10. Компетентността в това изследване следва да се установи, като се демонстрира способността за възпроизвеждане на очакваните резултати за честотите на структурните хромозомни аберации в сперматогонии с положителни контроли (включително слаби отклици), като например изброените в таблица 1, и получаване на честоти при отрицателни контроли, които съответстват на приемлив набор от данни за контроли в публикуваните референтни източници (напр. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) или на разпределението на контролите от предходни периоди на дадената лаборатория, ако има такава.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Подготовка

Избор на животински вид

11. Следва да се използват обичайно използвани в лабораториите породи от здрави млади полово зрели животни. Най-често използвани са мъжките мишки; въпреки това обаче, когато е научно оправдано, може да се използват мъжки индивиди и от друг подходящ вид бозайници, като това изпитване може да се провежда съвместно с друг метод за изпитване. В доклада следва да се посочи научната обосновка за използването на видове, различни от гризачи.

Условия на отглеждане и хранене на животните

12. За гризачи, в помещението, в което се намират животните, температурата следва да е 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Въпреки че в идеалния случай относителната влажност следва да бъде 50—60 %, тя трябва да е поне 40 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по този път. Гризачите следва да бъдат настанени в малки групи (не повече от пет в клетка), ако не се очаква агресивно поведение, за предпочитане в клетки с плътен под и подходящо облагородяване на жизнената среда. Животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано.

Подготовка на опитните животни

13. Обикновено се използват здрави, млади, пораснали животни (на възраст 8-12 седмици към началото на третирането), които се отделят на произволен принцип на контролни и опитни групи. Отделните животни се идентифицират индивидуално единствено чрез хуманни, минимално инвазивни методи (напр. чрез опръстеняване, поставяне на марка, микрочип или биометрична идентификация, но не и чрез изрязване на уши или пръсти) и се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Кръстосаното замърсяване с положителната контрола и с изпитвания химикал следва да се избягва. При започване на изследването вариациите в теглото на отделните животни следва да бъде минимално и да не е повече от $\pm 20\%$.

Приготвяне на дозите

14. Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват

пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение и посочват подходящите условия за съхранение.

Условия на изпитване — Разтворител/носител

15. Разтворителят/носителят не следва да има токсични ефекти при използваните нива на доза, като също така не следва да е възможна химическа реакция с изпитваните химикали. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се винаги когато е възможно първо да се разгледа възможността за използването на воден разтворител/носител. Примери за обичайно използвани съвместими разтворители/носители са водата, физиологичният разтвор, разтворът на метилцелулоза, разтворът на натриевата сол на карбоксиметилцелулозата, маслиновото масло и царевичното масло. При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, които показват, че избраният атипичен разтворител/носител не предизвиква структурни хромозомни аберации и други неблагоприятни ефекти, трябва да се направи първоначално изследване, за да се установи допустимостта на контролата на разтворител/носител.

Положителни контроли

16. Винаги следва да се използват паралелни положителни контролни животни, освен ако лабораторията е доказала пригодността си за провеждане на изпитването и е използвала рутинно изпитването в близкото минало (например през последните 5 години). Когато не е включена паралелна положителна контролна група, във всеки опит следва да се включат контроли на преброяването (фиксиран и неоцветен предметни стъкла). Те могат да бъдат получени като в преброяването на проучването се включат подходящи референтни проби, които са били получени и съхранявани при отделен опит с положителни контроли, провеждан периодично (например на всеки 6—18 месеца) в лабораторията, в която се провежда изпитването; например, по време на изпитвания за пригодност и редовно след това, когато това е необходимо.
17. Веществата за положителни контроли следва надеждно да водят до повишаване на честотата на клетки със структурни хромозомни аберации над спонтанните равнища, което може да бъде открито. Дозите за положителните контроли следва да са избрани така, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на преброяващия идентичността на кодираните проби. Примери за вещества за положителни контроли са включени в таблица 1.

Таблица 1: Примери за вещества за положителни контроли.

Вещества [CAS №] (референтен номер)
Циклофосфамид (монохидрат) [CAS № 50-18-0 (CAS № 6055-19-2)] (9)

Циклохексиламин [CAS № 108-91-8] (7)
Митомицин С [CAS № 50-07-7] (6)
Мономерен акриламид [CAS 79-06-1] (10)
Триетиленмеламин [CAS 51-18-3] (8)

Отрицателни контроли

18. Животни от отрицателни контроли, третирани само с разтворител или носител, и с които в друго отношение се борава по същия начин, както с третираните групи, следва да се включат за всеки момент на пробовземане. При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният разтворител/носител не предизвиква никакви хромозомни аберации или други неблагоприятни ефекти, за всеки момент на пробовземане следва да бъдат включени и животни от нетретирани контроли, за да се установи допустимостта на контролата на носител.

ПРОЦЕДУРА

Брой животни

19. В началото на изследването трябва да се определят размерите на групите, като целта е във всяка група да има поне 5 мъжки животни. Този брой на животните на група се счита за достатъчен за осигуряване на адекватна статистическа мощност (т.е. като цяло, да може да открие поне удвояване на честотата на хромозомна аберация, когато нивото на отрицателната контрола е 1,0 % или по-високо с вероятност 80 % на ниво на значимост от 0,05) (3) (11). Като насока за типичните изисквания за максималния брой животни, за изследване с два момента на вземане на проби, три групи според нивото на дозата и паралелна отрицателна контролна група, плюс положителна контролна група (всяка от които е съставена от пет животни), са необходими 45 животни.

График на третиране

20. Обикновено изпитваните химикали се дават само веднъж (т.е. като еднократно третиране); може да бъдат използвани други режими на определяне на дозата, при условие, че това е научно обосновано.
21. В групата с най-висока доза проби се вземат два пъти след третирането. Тъй като необходимото време за прием и метаболизъм на изпитвания/изпитваните химикал(и), както и неговия/техните ефект върху кинетиката на клетъчния цикъл може да окаже влияние върху оптималното време за откриване на хромозомна аберация, се използва един ранен и един късен момент за вземане на пробата, приблизително 24 и 48 часа след третирането. За дози различни от максималната, трябва да се избере ранният момент за вземане на проби, т.е. 24 часа (по-малко или равно на времето на клетъчния цикъл на

сперматогонии от тип Б, като по този начин се оптимизира вероятността за съвпадение с първите метафази след третиране) след третирането, освен ако не е известно друго, по-подходящо и оправдано време за вземане на проби.

22. Могат да се използват и други времена за вземане на проби. Например в случая с химикали, които предизвикват S-независими ефекти, по-ранните моменти за вземане на проби (т.е. по-малко от 24 ч.) могат да бъдат по-подходящи.
23. Може да се използва режим на повторно третиране с дозата, като например във връзка с изпитване при друга крайна точка, което използва 28 -дневен период на прилагане (напр. МИ Б.58); за да се приложат различни моменти на вземане на пробите обаче, ще бъдат необходими допълнителни групи животни. Съответно, целесъобразността на такъв график трябва да бъде оправдана от научна гледна точка за всеки отделен случай.
24. Преди евтаназията, животните се инжектират интраперитонеално с подходяща доза от химикал за блокиране на метафазата (напр. Колцемид[®] или колхицин). След това, след подходящ интервал, от животните се взема проба. За мишки и плъхове този интервал е приблизително 3—5 часа.

Нива на доза

25. Ако се извършва предварително изследване за определяне на обхвата, поради това че към съответния момент няма подходящи данни, които да подпомогнат избора на доза, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същият вид, порода и режим на третиране, който се използва и в главното изследване, съгласно препоръките за провеждане на изследвания за определяне на обхвата на дозиране (12). С проучването следва да се направи опит да се установи максималната допустима доза (МДД), определена като дозата, предизвикваща слаби токсични ефекти спрямо продължителността на периода на изследването (например неестествено поведение или реакции, леко подтискане на телесното тегло или цитотоксичност за хемопоетичната система), но без смърт или доказателства за болка, страдание или дистрес, които изискват евтаназия на животните (13).
26. Най-високата доза може да се дефинира и като дозата, която предизвиква известни признаци на токсичност в сперматогониалните клетки (напр. намаляване на съотношението на сперматогониалните митози спрямо първата и втората мейотична метафаза). Това намаляване не следва да надвишава 50%.
27. Изпитвани химикали със специфична биологична активност при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) и химикали, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай.

28. С цел получаване на информация за дозата и отклика, дадено пълно проучване следва да включва отрицателна контролна група (точка 18) и най-малко три нива на доза, обикновено разделени с кратност 2, но не по-голяма от 4. Ако изпитваният химикал не предизвиква токсичност в изследването за определяне на обхвата или въз основа на съществуващите данни, най-високата доза за отделно прилагане следва да бъде 2000 mg/kg телесно тегло. Ако обаче изпитваният химикал предизвиква токсичност, МДД следва да бъде най-високата приложена доза и използваните нива на доза следва за предпочитане да са в обхват от максималната доза до доза, която, предизвиква слаба токсичност или липса на токсичност. Когато бъде забелязана токсичност за прицелната тъкан (т.е. тестиса) при всички изпитани нива на дозата, препоръчително е провеждане на допълнително проучване при не-токсични дози. За проучванията, целящи по-подробно характеризиране на количествената информация за доза-отклик, може да се изискват допълнителни групи на определена доза. За някои типове изпитвани химикали (напр. фармацевтични продукти за хуманна употреба), обхванати от специфични изисквания, тези граници могат да варират. Ако изпитваният химикал предизвиква токсичност, следва да бъдат избрани пределната доза плюс две по-ниски дози (както е описано по-горе). Пределната доза за период на прилагане от 14 дни или повече е 1000 mg/kg телесно тегло/ден, а за периоди на прилагане от по-малко от 14 дни пределната доза е 2000 mg/kg телесно тегло/ден.

Прилагане на дозите

29. При планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Поради това като обосновани могат да бъдат избрани например пътища на експозиция като хранителен режим, питейна вода, локално подкожно, интравенозно, локално, орално (през сонда), инхалаторно или имплантация. Във всички случаи пътят следва да се избере така, че да осигури достатъчна експозиция на прицелната тъкан. Обикновено не се препоръчва интраперитонеално инжектиране, освен ако не е научно обосновано, тъй като това не е обичаен, физиологично относим път на експозиция на човека. Ако изпитваният химикал се смеси в хранителния режим или в питейната вода, по-специално в случай на еднократно дозиране, следва да се положи грижа закъснението между консумацията на храна и вода и пробовземането да е достатъчно, за да позволи откриването на ефектите (вж. точка 33). Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът обичайно не следва да превишава 1 ml на 100 g телесно тегло, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, при които могат да бъдат използвани 2 ml на 100 g телесно тегло. Обеми, по-високи от този (ако това е позволено от законодателството за хуманно отношение към животните), следва да се обосноват. Варирането на обема на изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията, за да се осигури постоянен обем спрямо телесното тегло при всички нива на доза.

Наблюдения

30. Общи клинични наблюдения върху изпитваните животни следва да бъдат извършвани поне един път дневно и клиничните признаци следва да бъдат записвани, за предпочитане по едно и също време (или времена) веднъж дневно и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Поне два пъти дневно всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност. Теглото на всички животни следва да се измерва в началото на изследването, поне един път в седмицата по време на изследвания с повтаряща се доза, и при умъртвяването. При изследвания с продължителност най-малко една седмица консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животни, проявяващи нелетални признаци на прекалена токсичност, следва да се умъртвят преди приключването на периода на изпитване (13).

Приготвяне на хромозомите

31. Незабавно след евтаназията, от един или от двата тестиса се приготвят суспензии на зародишни клетки, експонират се на хипотоничен разтвор и се фиксират, следвайки установените протоколи (напр. (2) (14) (15)). След това клетките се разнасят по предметните стъкла и се оцветяват (16) (17). Всички предметни стъкла следва да бъдат кодирани така, че тяхната идентичност да не бъде на разположение на преброяващия.

Анализ

32. За всяко животно следва да се анализират най-малко 200 добре разнесени метафази (3) (11). Ако честота на отрицателните контроли за предходни периоди е $< 1\%$, следва да се анализират повече от 200 клетки/животно, за да се увеличи статистическата мощност (3). Следва да се използват методи за оцветяване, които позволяват идентификация на центромерата.

33. Хромозомният и хроматидният и тип аберации следва да се отчитат поотделно и да се класифицират по подтипове (разкъсвания, обмени). Празнините следва да се записват, но да не се вземат под внимание при определяне дали даден химикал предизвиква съществено увеличение на случаите на клетки с хромозомни аберации. Процедурите, използвани в лабораторията, следва да гарантират, че анализът на хромозомните аберации от се извършва от добре обучени преброители. Като се има предвид, че процедурите за подготовка на предметните стъкла често водят до прекъсване на известен процент от метафазите със съответната загуба на хромозоми, преброените клетки следва да съдържат известен брой центромери – не по-малко от $2n \pm 2$, където n е хаплоидният брой хромозоми за съответния биологичен вид.

34. Въпреки че целта на изпитването е да се открият структурни хромозомни аберации, важно е да се запишат честотите на полиплоидните клетки и клетките с ендоредуплицирани хромозоми, когато се наблюдават такива събития (вж. точка 44).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

35. Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. За всяко животно следва да се оцени броят на клетките със структурна(и) хромозомна(и) аберация(и) и броят на хромозомните аберации на клетка. Хроматидният и хромозомният тип аберации, класифицирани по подтипове (разкъсвания, обмени) следва да се изброят поотделно със съответния брой и честота за експерименталните и контролните групи. Празнините се записват отделно. Честотата на празнините се отчита, но като цяло не се включва в анализа на общата честота на структурни хромозомни аберации. Процентът на полиплоидия и клетки с ендоредуплицирани хромозоми се отчита, ако е наблюдаван.
36. Трябва да бъдат протоколирани данните за токсичност и клиничните признаци (както е посочено в точка 30).

Критерии за приемливост

37. Следните критерии определят приемливостта на дадено изпитване.
- Паралелната отрицателна контрола е в съответствие с публикуваните норми за данните за отрицателните контроли от предходни периоди, които като цяло се очаква да бъдат $> 0\%$ и $\leq 1,5\%$ клетки с хромозомни аберации, както и с данните за контролите от предходни периоди на лабораторията, ако има такива (вж. точки 10 и 18).
 - Паралелни положителни контроли предизвикват отклици, които са в съответствие с публикуваните норми за данни от положителни контроли от предходни периоди, или с базата данни на дадената лаборатория за положителни контроли за предходни периоди, ако са налични, и предизвикват статистически значимо увеличение в сравнение с отрицателната контрола (вж. точки 17, 18).
 - Анализирани са достатъчен брой клетки и дози (вж. точки 28 и 32).
 - Критериите за избор на най-високата доза съответстват на описаните в точки 25 и 26.
38. Ако се наблюдават митоза и мейоза, съотношението на сперматогониалните митози спрямо първата и втората мейотична метафаза следва да се определи като мярка за цитотоксичността за всички третиращи и отрицателни контролни животни в обща проба от 100 делящи се клетки на животно. Ако се наблюдава само митоза, митотичният индекс следва да бъде определен в минимум 1000 клетки за всяко животно.

Оценка и тълкуване на резултатите

39. Най-малко три третиращи с определена доза групи трябва да бъдат анализирани, за да бъдат получени достатъчно данни за анализ доза-отговор.

40. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако:

- при най-малко една от изпитваните дози се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола;
- увеличението е свързано с дозата поне в един момент на вземане на проба; както и
- някои от резултатите са извън допустимия диапазон за данните от отрицателните контроли или разпределението на данните на лабораторията за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. разпределение на Поасон с граница на контрол 95 %), ако е на разположение.

След това се счита, че изпитваният химикал е в състояние да предизвика хромозомни аберации в сперматогониалните клетки на изпитваните животни. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят и в литературните източници (11) (18). При използваните статистически тестове за опитна единица следва да се счита животното.

41. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако:

- в никоя от изпитваните дози не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола;
- няма свързано с дозата увеличение в нито едно от опитните условия; както и
- всички резултати са извън допустимия размах за данните от отрицателните контроли, или данните на лабораторията за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. разпределение на Поасон с граница на контрол 95 %), ако е на разположение.

След това изпитваният химикал се счита за неспособен да предизвика хромозомни аберации в сперматогониалните клетки на изпитваните животни. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят и в литературните източници (11) (18). Отрицателният резултат не изключва възможността химикалът да предизвиква хромозомни аберации на по-късни неизследвани фази от развитието, или генни мутации.

42. Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

43. Ако откликът не е категорично отрицателен или положителен, и с цел да се подпомогне установяването на биологичната относимост на даден резултат (например слабо или гранично увеличение), данните следва да бъдат оценени чрез експертна оценка и/или допълнителни проучвания, като се използват съществуващите опитни данни, като например разглеждане дали положителният резултат е извън допустимия размах на данните за отрицателните контроли, или данните за отрицателните контроли за предходни периоди за дадената лаборатория (19).

44. В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати и следователно се заключава, че е неясен.
45. Увеличение на броя на полиплоидните клетки може да показва, че изпитваният химикал е способен да инхибира митотичните процеси и да предизвиква бройни хромозомни аберации (20). Увеличаване на броя на клетките с ендоредуплицирани хромозоми може да показва, че изпитваният химикал има потенциала да инхибира развитието на клетъчния цикъл (21) (22), което е различен от инхибирането на митотичните процеси механизъм за предизвикване на бройни хромозомни изменения (вж. точка 2). Поради това наличието на полиплоидни клетки и клетки с ендоредуплицирани хромозоми следва да се записва отделно.

Протокол от изпитването

46. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Резюме

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Приготвяне на химикала за изпитване:

- обосновка за избора на носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител.

- приготвяне на формулировките за хранителен режим, питейна вода или инхалация;
- аналитични определяния, свързани с формулировките (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации)
- когато са извършвани такива.

Изпитвани животни:

- използван вид/порода и обосновка за избора;
- брой и възраст на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- метод за еднозначно идентифициране на животните
- за краткосрочни изследвания: индивидуално тегло на животните в началото и в края на изпитването; за изследвания, по-дълги от една седмица: индивидуални телесни тегла по време на проучването и консумация на храна. Следва да бъдат включени размахът, средната стойност и стандартното отклонение при телесното тегло за всяка група.

Условия на изпитването:

- данни за положителните и отрицателните (носител/разтворител) контроли;
- данни от изследването за определяне на обхвата, ако е провеждано такова;
- обосновка за избора на нивото на доза;
- обосновка на пътя на прилагане;
- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка за времето на умъртвяване;
- методи за измерване на токсичността за животните, включително, когато е необходимо, хистопатологични или хематологични анализи и честота, с която са правени наблюдения върху животните или е измервано телесното тегло;
- методи за проверка дали изпитваният химикал е достигнал до прицелната тъкан, или до общото кръвообращение, ако са получени отрицателни резултати;
- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;

- метод за умъртвяване;
- метод на аналгезия (когато е използвана)
- процедури за изолиране на тъкани;
- идентичност на химикала, блокиращ метафазата, неговата концентрация и времетраене на третирането;
- методи на приготвяне на предметни стъкла;
- критерии за преброяване на аберациите;
- брой анализирани клетки на животно;
- критерии за обявяване на изследванията за положителни, отрицателни или двусмислени.

Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- телесно и органно тегло към момента на умъртвяване (ако са прилагани множество третираня, телесното тегло се записва по време на режима на третиране);
- признаци за токсичност;
- митотичен индекс;
- съотношение на сперматогониални митози спрямо първата и втората мейотична метафаза или друго доказателство за експозиция на прицелната тъкан;
- тип и брой на аберациите, дадени поотделно за всяко животно;
- общ брой на аберациите на група, със средни стойности и стандартни отклонения;
- брой клетки с аберации на група, със средни стойности и стандартни отклонения;
- взаимоотношение доза-отклик, където е възможно;
- статистически анализи и използвани методи;
- данни от паралелни положителни контроли;
- данни от отрицателни контроли от предходни периоди с обхвати, средни стойности, стандартни отклонения и 95% доверителен интервал (когато има), или публикувани данни от отрицателни контроли от предходни периоди, използвани за приемливост на резултатите от изпитванията;
- данни от паралелни положителни контроли;
- промени в плоидията, ако са наблюдавани, включително честоти на полиплоидност и/или ендоредуплицирани клетки.

Обсъждане на резултатите

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

(22)

Допълнение

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Анеуплоидия: всяко отклонение от обичайния диплоиден (или хаплоиден) брой на хромозомите с една или повече от една хромозома, но не и с цял набор (или набори) от хромозоми (полиплоидия).

Центромера: област (области) от хромозомата, с която нишки от делителното вретено се свързват по време на клетъчното делене, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

Химикал: Вещество или смес

Хромозомно разнообразие: разнообразие на формите (напр. метацентрични, акроцентрични и др.) и размерите на хромозомите.

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване на единични хроматиди или разкъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване или разкъсване и повторно съединяване на двете хроматиди на идентично място.

Кластоген: всеки химикал, който причинява структурни аберации от хромозомен тип в популации от клетки или организми.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимално отклонение в реда на хроматида(ите).

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждане на ДНК или хромозоми, включително разкъсвания, делеции, адукти, нуклеотидни модификации и връзки, пренареждания, мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички типове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.“

Митотичен индекс (MI): съотношението на клетки в метафаза, разделени на броя клетки, наблюдавани в клетъчна популация; показател за степента на пролиферация на тази популация.

Митоза: деленето на клетъчното ядро, което обикновено се разделя на профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза.

Мутагенен: води до наследствена промяна на ДНК последователност(и) на базовите двойки в гени, или на структурата на хромозоми (хромозомни аберации).

Бройна аномалия: промяна в броя на хромозоми в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните животни.

Полиплоидия: множество на хapлоидния брой хромозоми (n) различно от диплоидния брой (т.е., $3n$, $4n$ и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива при микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното делене, наблюдавана като делеции и фрагменти, обмени.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

UVCB: Химични вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции и биологични материали“

5) В Част Б глава Б.40 се заменя със следното:

„Б.40 КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ КОЖАТА *IN VITRO*: МЕТОД НА ИЗПИТВАНЕ С ИЗМЕРВАНЕ НА ТРАНСКУТАННОТО ЕЛЕКТРИЧЕСКОТО СЪПРОТИВЛЕНИЕ (TER)

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 430 (2015). Корозивното действие върху кожата се разбира като причиняване на необратимо увреждане на кожата, проявяващо се като видима некроза през епидермиса и в дермата, настъпило след прилагане на изпитван химикал [както е дефиниран от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетироване на химикали (GHS) на Обединените нации (ООН) (1) и Регламент на Европейския съюз (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетироването и опаковането на вещества и смеси (CLP)¹]. Настоящият актуализиран метод за изпитване Б.40 осигурява процедура *in vitro*, позволяваща идентификацията на вещества и смеси с некорозивно или корозивно действие в съответствие с GHS на ООН (1) и CLP
2. Оценяването на потенциала за корозивно действие върху кожата обикновено включва използването на лабораторни животни (МИ Б.4, еквивалентен на ОИСП TG 404 първоначално приет през 1981 г. и ревизиран през 1992 г., 2002 г. и 2015 г.) (2). В допълнение към настоящия МИ Б.40 бяха валидирани и приети други методи за изпитване *in vitro* на потенциала за корозивно действие върху кожата на химикали, а именно МИ Б.40bis, еквивалентен на ОИСП TG 431) (3) и МИ Б.65 (еквивалентен на ОИСП TG 435) (4), които също могат да идентифицират подкатегории химикали с корозивно действие, когато е необходимо. Бяха приети няколко валидирани метода за изпитване *in vitro*, напр. МИ Б.46 (еквивалентен на ОИСП TG 439 (5), за да бъдат използвани за изпитването на дразнене на кожата. В Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи към изпитването и оценката (IATA) на корозивното и дразнещото действие върху кожата се описват няколко модула, които обединяват различни източници на информация и инструменти за анализ, и се предоставят насоки за i) интегрирането и използването на съществуващи данни от изпитвания и данни, различни от тези от изпитвания, за оценка на потенциала на химикалите за дразнене на

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетироването и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

кожата и за корозивно действие върху кожата и ii) се предлага подход при необходимост от по-нататъшно изпитване (6).

3. Настоящият метод за изпитване разглежда корозивното действие върху кожата по отношение на човешкото здраве (крайна точка). Той се базира на метода на изпитване с измерване на транскутанното електрическо съпротивление (TER) на кожата на плъх, при който се използват дискове от кожа на плъх за идентифициране на веществата с корозивно действие по тяхната способност да предизвикват загуба на нормалната цялост на *stratum corneum* и на бариерната функция. Съответните насоки за изпитване на ОИСП са приети първоначално през 2004 г. и са актуализирани през 2015 г., за да се включи препратка към Ръководството за IATA.
4. За да се оцени изпитването *in vitro* за корозивно действие върху кожата за регулаторни цели, бяха проведени предварителни изследвания за валидиране (7), последвани от официално изследване за валидиране на метода за изпитване с измерване на TER на кожата на плъх за оценяване на корозивното действие върху кожата (8) (9) (10) (11). Резултатът от тези проучвания доведе до препоръката, че методът за изпитване с измерване на TER (определен като валидиран референтен метод — VRM) би могъл да се използва за регулаторни цели, за оценка *in vivo* на корозивно въздействие върху кожата (12) (13) (14).
5. Преди предложен подобен или модифициран метод *in vitro* за изпитване с измерване на транскутанното електрическо съпротивление за определяне на корозивното действие върху кожата, различен от VRM, да може да бъде използван за регулаторни цели, следва да се определи неговата надеждност, относимост (точност) и ограничения за предложената употреба, за да се осигури неговото сходство с VRM в съответствие с изискванията на Стандартите за ефективност (СЕ) (15). Взаимното приемане на данните от ОИСП се гарантира само след като всеки предложен нов или актуализиран метод за изпитване, съответстващ на СЕ, е бил разгледан и включен в съответните насоки за изпитване на ОИСП.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6. Използваните определения са дадени в допълнението.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. В едно изследване за валидиране (10) и в други публикувани проучвания (16) (17) се докладва, че методът за изпитване с определяне на TER на кожата на плъх може да различава известни корозивни за кожата вещества от други вещества, които са некорозивни за кожата, като общата чувствителност е 94% (51/54) и специфичността – 71% (48/68) при база данни от 122 вещества.

8. Настоящият метод на изпитване се отнася за корозивното действие върху кожата *in vitro*. Той позволява идентифициране на некорозивни и корозивни изпитвани химикали в съответствие с GHS на ООН/CLP. Както е демонстрирано от изследванията за валидиране (8) (9) (10) (11), ограничението на този метод за изпитване е, че той не позволява подкатегоризация на веществата и смесите с корозивно действие в съответствие с GHS на ООН/CLP. Начинът, по който ще се използва този метод за изпитване, ще се определи от приложимата регулаторна рамка. Тъй като този метод за изпитване не осигурява адекватна информация за кожното дразнене, следва да се отбележи, че МИ Б.46 специално разглежда въздействието върху здравето — кожно дразнене *in vitro* (5). За пълна оценка на локалните кожни въздействия след еднократна дермална експозиция следва да се направи справка с Ръководството на ОИСП относно IATA (6).
9. В рамките на валидирането на настоящия метод за изпитване са изпитани широк набор от химикали, представляващи основно вещества, като емпиричната база данни на изследването за валидиране наброява 60 вещества, покриващи широк диапазон от химични класове (8) (9). Въз основа на цялостните налични данни, методът за изпитване е приложен за широк диапазон от химични класове и агрегатни състояния, включително течности, полутвърди и твърди вещества и восъци. Все пак, тъй като за специфичните агрегатни състояния няма лесно достъпни обекти за изпитване с подходящи справочни данни, следва да се отбележи, че по време на валидирането бяха оценени сравнително малък брой восъци и корозивни твърди вещества. Течностите могат да бъдат или да не бъдат водни разтвори; твърдите вещества може да са разтворими или неразтворими във вода. В случаите, когато с доказателства може да се демонстрира неприложимостта на метода за изпитване спрямо специфична категория вещества, той не следва да се използва за тази специфична категория вещества. В допълнение, този метод за изпитване се приема за приложен към смеси като разширение на неговата приложимост за вещества. Въпреки това обаче, поради факта, че смесите покриват широк спектър категории и състави и че понастоящем е налична само ограничена информация за изпитването на смеси, в случаите, когато с помощта на доказателства може да се демонстрира неприложимостта на метода за изпитване за специфична категория смеси (*напр.* съгласно стратегия, предложена от Eskes *et al.*, 2012) (18), методът на изпитване не следва да се използва за тази специфична категория смеси. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Газовете и аерозолите все още не са оценени с изследване за валидиране (8) (9). Макар да се предполага, че те могат да бъдат изпитвани като се използва методът с измерване на TER, настоящият метод не дава възможност за изпитване на газове и аерозоли.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

10. Изпитваният химикал се прилага за период до 24 часа върху епидермалните повърхности на кожните дискове в опитна постановка с две отделения, при която кожните дискове служат като преграда между отделенията. Кожните дискове се вземат от хуманно убити плъхове на възраст 28—30 дни. Корозивните химикали се идентифицират по способността им да предизвикат загуба на нормалната цялост на *stratum corneum* и бариерната функция, която се измерва като намаление на TER под праговото ниво (16) (вж. точка 32). За TER на кожата на плъхове е избрана гранична стойност от 5kΩ на базата на голям брой данни за широк кръг вещества, при които по-голямата част от стойностите са определено доста над (често > 10 kΩ), или доста под (често < 3 kΩ) тази стойност (16). Като цяло, изпитваните химикали, които са некорозивни, но са дразнещи или недразнещи за животните, не намаляват TER под този гранична стойност. Нещо повече, използването на кожни препарати или друга апаратура може да промени граничната стойност, като изисква допълнително валидиране.
11. В процедурата за изпитване е включен етап за фиксиране на оцветител за потвърждение на положителните резултати от TER, включващи стойности около 5 kΩ. Етапът с фиксиране на оцветител определя дали увеличаването на йонната проникваемост се дължи на физическо разрушаване на *stratum corneum*. Методът с измерване на TER с използване на кожа от плъхове показва, че с него може да се прогнозира *in vivo* корозивността при зайци, оценявана съгласно МИ Б.4 (2).

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

12. Преди да започнат рутинно прилагане на метод с измерване на TER на кожата на плъх, който спазва изискванията за настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да демонстрират техническа компетентност чрез правилно класифициране на дванадесетте опитни вещества, препоръчани в таблица 1. Когато дадено вписано вещество не е налично или когато е обосновано може да се използва друго вещество, за което има налични адекватни *in vivo* и *in vitro* справочни данни (напр. от списъка на референтните химикали (16)), при условие че се прилагат същите критерии за избор, които са описани в таблица 1.

Таблица 1: Списък на веществата за изпитване за пригодност¹

Вещество	CASRN	Химичен клас ²	GHS на OOH/CLP Кат. на базата на <i>In Vivo</i> резултати ³	VRM Кат. на базата на <i>In Vitro</i> резултати	Агрегатно състояние	pH ⁴
<i>In Vivo</i> корозивни вещества						

Вещество	CASRN	Химичен клас ²	GHS на ООХ/CLP Кат. на базата на <i>In Vivo</i> резултати ³	VRM Кат. на базата на <i>In Vitro</i> резултати	Агрегатно състояние	pH ⁴
N,N'-диметил дипропилен триамин	10563-29-8	органична основа	1A	6 x C	L	8,3
1,2-Диаминопропан	78-90-0	органична основа	1A	6 x C	L	8,3
Сярна киселина (10%)	7664-93-9	неорганична киселина	(1A)/1B/1C	5 x C 1x NC	L	1,2
Калиев хидроксид (10% воден разтвор)	1310-58-3	неорганична основа	(1A)/1B/1C	6 x C	L	13,2
Октанова (каприлова)	124-07-2	органична киселина	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,6
2-трет-бутилфенол	88-18-6	фенол	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,9
<i>In Vivo</i> некорозивни вещества						
Изостеаринова киселина	2724-58-5	органична киселина	NC	6 x NC	L	3,6
4-амино-1,2,4-триазол	584-13-4	органична основа	NC	6 x NC	S	5,5
Фенетил бромид	103-63-9	електрофил	NC	6 x NC	L	3,6
4-(метилтио)-бензалдехид	3446-89-7	електрофил	NC	6 x NC	L	6,8
1,9-декадиен	1647-16-1	неутрално органично	NC	6 x NC	L	3,9
Тетрахлороетилен	127-18-4	неутрално органично	NC	6 x NC	L	4,5

Съкращения: aq = воден разтвор; CASRN = Номер в регистъра на Химическата реферативна служба; VRM = Валидиран референтен метод; ND = не е определено.

¹Веществата за изпитване за пригодност, сортирани първо като корозивни или некорозивни, след това в подкатегории според корозивното си действие и накрая по химичен клас, бяха избрани от веществата, използвани във изследването за валидиране на ECVAM на метода за изпитване с TER на кожа от плъх (8) (9). Освен ако не е указано друго, веществата бяха изпитвани при ниво на чистота, получено при купуването им от търговски източник (8). Подборът включи, доколкото е възможно, вещества, които: i) са представителни за диапазона на реакции на корозивност (*напр.* без корозивно действие; вещества със слабо до силно корозивно действие), които могат да се измерят или прогнозираят с помощта на VRM; ii) са представителни за химичните класове, използвани в изследването за валидиране; iii) отразяват характеристиките на ефективност на VRM; iv) имат добре определена химическа структура; v) предизвикват окончателни резултати в референтния метод за изпитване *in vivo*; vi) се предлагат в търговската мрежа; и vii) не са свързани с прекалено високи разходи за извеждане от употреба.

²Химичен клас, назначен от Barratt *et al.* (8).

³Съответстващите групи за опаковане на ООХ са съответно I, II и III за категории 1A, 1B и 1C от GHS на ООХ/CLP.

⁴Стойностите за pH са получени от Fentem *et al.* (9) и Barratt *et al.* (8).

ПРОЦЕДУРА

13. Налични са стандартни оперативни процедури (SOP) за метода за изпитване с измерване на TER на кожа от плъх за корозивно действие върху кожата (19). Методите за изпитване с измерване на TER на кожа от плъх, обхванати от настоящия метод за изпитване, следва да изпълняват следните условия:

Животни

14. За този метод за изпитване следва да се използват плъхове, защото чувствителността към вещества на кожата им в рамките на изпитването вече е била демонстрирана (12) и те са единственият източник на кожа, който е бил официално валидиран (8) (9). Възрастта (когато се взема кожата) и породата на плъха са особено важни, за да е сигурно, че фоликулите на козината им са в латентна фаза преди да започне растежът на козина на възрастно животно.
15. Дорзалната и странична козина от млади, на възраст около 22 дни, мъжки или женски плъхове (от породата Wistar или друга сравнима), внимателно се отстранява с малки пинцети. После животните се измиват с бавно бърсане, като повърхността с отстранена козина се потапя в антибиотичен разтвор (съдържащ например стрептомицин, пеницилин, хлорамфеникол и амфотерицин при концентрации, ефективни за инхибирането на бактериалния растеж). Животните се измиват с антибиотици отново на третия или четвъртия ден след първото измиване и се използват в рамките на 3 дни след второто измиване, когато *stratum corneum* се възстановил от отстраняването на козината.

Подготовка на кожните дискове

16. Животните се убиват по хуманен начин на възраст 28—30 дена; тази възраст е критична. Дорзо-латералната кожа на всяко животно се отстранява и от нея се премахва излишната подкожна мазнина чрез внимателно обелване и отделяне от кожата. Изрязват се кожни дискове, всеки с диаметър от приблизително 20 mm. Кожата може да се съхрани, преди да се използват дисковете, когато се покаже, че положителните и отрицателните контролни данни са еквивалентни на тези, получени от прясна кожа.
17. Всеки кожен диск се поставя над единия от краищата на тръба от PTFE (политетрафлуороетилен), като се внимава епидермалната повърхност да бъде в контакт с тръбата. Гумен О-пръстен се прикрепва с натиск към края на тръбата, за да държи кожата на място, а излишната тъкан се изрязва. След това гуменият О-пръстен се уплътнява внимателно към края на тръбата от PTFE с вазелин. Тръбата се поддържа от пружинна щипка във вътрешността на приемна камера, съдържаща разтвор на $MgSO_4$ (154 mM) (фигура 1). Кожният диск трябва да бъде напълно потопен в разтвора на $MgSO_4$. От един единствен плъх могат да се получат 10—15 кожни диска. Размерите на тръбата и О-пръстена са показани на фигура 2.

18. Преди да започне изпитването, се измерва транскутанното електрическо съпротивление (TER) на два кожни диска като процедура за качествен контрол за всяка животинска кожа. И двата диска трябва да показват стойности за електрическо съпротивление по-високи от 10 k Ω , за да могат останалите дискове да се използват за този метод за изпитване. Ако стойността на съпротивлението е по-ниска от 10 k Ω , останалите дискове от тази кожа трябва да се бракуват.

Прилагане на изпитвания химикал и веществата за контроли

19. За всяка серия (експеримент) трябва да се използват паралелно положителни и отрицателни контроли, за да се осигурят адекватни резултати от експерименталния модел. За всяка серия (експеримент) трябва да се използват кожни дискове само от едно животно. Предложените положителни и отрицателни контролни вещества са съответно 10M солна киселина и дестилирана вода.
20. Течните вещества за изпитване (150 μ l) се прилагат равномерно върху епидермалната повърхност в очертанията на тръбата. Когато се изпитват твърди материали, достатъчно количество от него се разпределя равномерно по диска, за да се гарантира, че е покрита цялата повърхност на епидермиса. Върху твърдото вещество се добавя дейонизирана вода (150 μ l) и тръбата леко се разклаща. За да се постигне максимален контакт с кожата, може да се наложи загряване на твърдото вещество до 30⁰ C, с цел изпитваното вещество да се разтопи или омекне, или разтрошаване на гранули или на прах.
21. За всяко изпитвателна серия (експеримент) се използват три кожни диска и контролен химикал. Изпитваните химикали се прилагат за период от 24 часа при температура 20—23⁰ C. Изпитваният химикал се отстранява чрез измиване със струя течаща вода при стайна температура, докато не остане материал, който да може да бъде отстранен.

Измервания на TER

22. Кожният импеданс се измерва чрез измерване на TER с помощта на променлив ток с ниско напрежение чрез измервателния мост на Уитстоун (18). Общите спецификации на измервателния мост са: работно напрежение 1—3 V, синусоидално или правоъгълно променливо напрежение с честота 50—1000 Hz и измервателен обхват от поне 1—30 k Ω . Измервателният мост, използван във изследването за валидиране, измерва индуктивност, капацитет и съпротивление до стойности съответно от 2000H, 2000 μ F, и 2 M Ω при честоти от 100Hz или 1kHz, като се използват серийни или паралелни стойности. За целите на изпитването TER за корозивност измерванията се записват като съпротивление при честота от 100 Hz и като се използват серийни стойности. Преди измерването на електрическото съпротивление се намалява повърхностното напрежение на кожата, като се добавя достатъчен обем 70 % етанол, за да се покрие епидермисът. След няколко секунди етанолът се отстранява от тръбата и след това тъканта се хидратираща чрез добавяне на 3 ml разтвор на MgSO₄ (154mM). Електродите на измервателния мост се

поставят от двете страни на кожния диск, за да измерят съпротивлението в $k\Omega$ /кожен диск (фигура 1). Размерите на електродите, а също и размерите на непокритата им част под „крокодилските“ щипки, са показани на фигура 2. Щипката, прикрепена към вътрешния електрод, се поставя в горния край на тръбата от PTFE по време на измерването на съпротивлението, за да се гарантира, че достатъчна дължина на електрода е потопена в разтвора на $MgSO_4$. Външният електрод се позиционира вътре в приемната камера, така че да се опре на дъното на камерата. Разстоянието между пружинната щипка и дъното на тръбата от PTFE се поддържа постоянно (фигура 2), тъй като това разстояние оказва влияние върху получената стойност на съпротивлението. Следователно разстоянието между вътрешния електрод и кожния диск трябва да бъде постоянно и минимално (1—2 mm).

23. Ако измерената стойност на съпротивлението е по-висока от $20 k\Omega$, това може да се дължи на отлагане на остатъци от изпитвания химикал по епидермалната повърхност на кожния диск. Може да се опита допълнително отстраняване на отлагането, например като се уплътни тръбата от PTFE с палец в ръкавица и като се разклати за около 10 секунди; разтворът на $MgSO_4$ се изхвърля и измерването на съпротивлението се повтаря с пресен разтвор на $MgSO_4$.
24. Свойствата и размерите опитната постановка и опитната процедура могат да повлияят на получените стойности на TER. Прагът на корозивно действие от $5 k\Omega$ е определен въз основа на данни, получени от специфичните опитна постановка и процедура, описани в настоящия метод за изпитване. Могат да бъдат прилагани различни прагове и контролни стойности, ако условията на изпитване се променят или се използва друга опитна постановка. Ето защо е необходимо да се калибрират методологията и праговите стойности на съпротивлението, като се изпитат серия от опитни вещества, избрани от веществата, използвани във изследването за валидиране (8) (9) или от химични класове, подобни на проучваните вещества. Набор от подходящи опитни вещества е показан в таблица 1.

Методи за фиксиране на оцветител

25. Излагането на някои некорозивни материали може да доведе до намаляване на съпротивлението под граничната стойност от $5 k\Omega$, при което се позволява преминаване на йони през *stratum corneum*, като по този начин се намалява електрическото съпротивление (9). Например, неутралните органични вещества и веществата, които имат повърхностноактивни свойства (включително детергенти, емулсификатори и други повърхностно-активни вещества) могат да отстранят кожните мазнини и така да направят бариерата по-проницаема за йони. Така, ако стойностите на TER, получени за тези химикали, са по-ниски от $5 k\Omega$ или са близки до тази стойност, при липса на видимо увреждане на кожните дискове, трябва да се направи оценка на проникването на оцветяващото вещество върху контролните и третираните тъкани, за да се определи дали получените стойности на TER се дължат на повишена пропускливост на кожата или на

корозивно действие върху кожата (7) (9). В последния случай, когато *stratum corneum* е нарушен, при прилагане на върху кожата повърхност на оцветителя сулфорходамин В, той бързо прониква в подлежащата тъкан и я оцветява. Този конкретен оцветител е устойчив на широк обхват от вещества и не се влияе от процедурата за екстракция, описана по-долу.

Приложение и отстраняване на оцветителя сулфорходамин В

26. След провеждането на оценката на TER, магнезиевият сулфат се отстранява от тръбата и кожата внимателно се изследва за видими увреждания. Ако липсва видимо и съществено увреждане (*напр.* перфорация), 150 μ l 10% (w/v) разтвор в дестилирана вода на оцветителя сулфорходамин В (Кисело червено 52; C.I. 45100; CAS номер 3520-42-1), се нанася върху епидермалната повърхност на всеки кожен диск за период от 2 часа. Тези кожни дискове след това се измиват в течаща вода при стайна температура, приблизително за 10 секунди, за да се премахне излишния/несвързан оцветител. Всеки кожен диск внимателно се отстранява от тръбата от PTFE и се поставя в стъкленица (*напр.* стъклена сцинтилационна стъкленица от 20-ml) съдържаща дейонизирана вода (8 ml). Стъклениците леко се разклащат за 5 минути, за да се отстрани всеки остатък от несвързан оцветител. Тази процедура за изплакване се повтаря, след което кожните дискове се свалят и се поставят в стъкленици, съдържащи 5ml 30 % (w/v) натриев додецилсулфат (SDS) в дестилирана вода и се инкубират де следващия ден при температура от 60⁰ C.
27. След инкубирането, всеки кожен диск се изважда и изхвърля, а останалата част от разтвора се центрофугира за около 8 минути при 21⁰ C (относителна центробежна сила ~175 x g). Проба от 1ml от супернатанта се разрежда 1 към 5 (v/v) [*m.e.* 1ml + 4ml] с 30 % (w/v) SDS в дестилирана вода. Оптичната плътност (OD) на разтвора се измерва при 565 nm.

Изчисляване на съдържанието на оцветител

28. Съдържанието на оцветителя сулфорходамин В на всеки диск се изчислява от стойностите на OD (9) (моларен коефициент на поглъщане на оцветителя сулфорходамин В при 565nm = $8,7 \times 10^4$; молекулно тегло = 580). Съдържанието на оцветителя се определя за всеки кожен диск с помощта на подходяща калибрационна крива и тогава се изчислява средното съдържание на оцветител за повторенията.

Критерии за приемливост

29. Средните резултати на TER се приемат, ако паралелните положителни и отрицателни контролни стойности попадат в допустимите граници за метода в лаборатория за изпитване. Допустимите граници на съпротивлението за методологията и опитната постановка, описани по-горе, са дадени в следната таблица:

Контрол	Вещество	Диапазон на

		съпротивлението (kΩ)
Положителна	10М Солна киселина	0,5—1,0
Отрицателно	Дестилирана вода	10—25

30. Средните резултати при оцветяване се приемат, при условие че паралелните контролни стойности попадат в допустимите граници за метода. Предложените граници за допустимо съдържание на оцветител за контролните вещества за методологията и опитната постановка, описани по-горе, са дадени в следната таблица:

Контрол	Вещество	Диапазон на съдържание на оцветител (µg/диск)
Положителна	10М Солна киселина	40 - 100
Отрицателно	Дестилирана вода	15—35

Обяснение на резултатите

31. Граничната стойност на TER, разграничаваща корозивни от некорозивни изпитвани химикали, е установена по време на оптимизацията на метода за изпитване, проведена по време на фазата преди валидирането и потвърдена в официалното изследване за валидиране.

32. Моделът за прогнозиране за метода за изпитване с измерване на TER на кожа от плъх за корозивно действие върху кожата (9) (19), свързан с класификационната система GHS на ООН/CLP, е даден по-долу:

Смята се, че изпитваният химикал е некорозивен за кожата:

- i) ако средната стойност на TER, получена за изпитвания химикал, е по-висока от ($>$) 5 kΩ, или
- ii) средната стойност на TER, получена за изпитвания химикал, е по-ниска или равна на ($\leq$) 5 kΩ, и
- кожните дискове не показват видимо увреждане (*напр.* перфорация), и
- средното съдържание на оцветител в диска е по-ниско от ($<$) средното съдържание на оцветител в диска на положителната контрола с 10М HCl, получени едновременно (вижте точка 30 за стойностите на положителната контрола).

Изпитваният химикал се разглежда като корозивен за кожата:

- i) ако средната стойност на TER, получена за изпитвания химикал, е по-ниска или равна на ($\leq$) 5 kΩ и кожните дискове показват видимо увреждане (*напр.* са перфорирани) или

- ii) средната стойност на TER, получена за изпитвания химикал, е по-ниска или равна на ($\leq$) 5 k Ω , и
 - кожните дискове не показват видимо увреждане (*напр.* перфорация), но
 - средното съдържание на оцветител в диска е по-високо или равно на ($\geq$) средното съдържание на оцветител в диска на положителната контрола с 10M HCl, получени паралелно (вижте точка 30 за стойностите на положителната контрола).
33. Една изпитвателна серия (експеримент), включваща поне три кожни диска за повторения, би следвало да е достатъчна за изпитването на даден химикал, когато класификацията е недвусмислена. При все това, при наличие на гранични резултати, *напр.* несъгласувани измервания на повторения и/или средна стойност на TER, равна на $5 \pm 0,5$ k Ω , следва да се разгледа възможността за провеждане на втора независима изпитвателна серия (експеримент), както и на трета, в случай на наличие на несъответстващи резултати между първите две изпитвателни серии (експерименти).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

34. Където е уместно, стойностите за съпротивлението (k Ω) и стойностите за съдържанието на оцветител (μ g/диск) за изпитвания химикал и за положителните и отрицателните контроли трябва да се протоколират в таблична форма, включително данните за всеки отделен диск за повторение от всяка изпитвателна серия (експеримент) и от средните стойности $\pm$ SD. Всички повторени експерименти трябва да се протоколират. Наблюдаваните увреждания по кожните дискове трябва да се протоколират за всеки изпитван химикал.

Протокол от изпитването

35. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал и контролни вещества:

- Вещество с една съставка: химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.;
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес: определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични/химични свойства на съставките;
- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- източник, номер на партидата, при наличност;

- Обработка на изпитвания химикал/веществото за контроли преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна;
- Условия за съхранение.

Изпитвани животни:

- Използвана порода и пол;
- Възраст на животните, когато се използват като донори;
- Източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- Подробна информация за подготовката на кожата.

Условия на изпитване:

- Калибрационни криви за опитната постановка;
- Калибрационни криви за ефективността на изпитването за оцветяване, филтър с лента на пропускане, използван за измерване на стойностите на OD (оптична плътност) и обхват на линейност на OD на измервателното устройство (*напр.* спектрофотометър), ако е уместно;
- Подробна информация за използваната процедура за измерване на TER;
- Подробна информация за използваната изпитвателна процедура за оценка на фиксирането на оцветител, ако е уместно;
- Използвани дози на изпитване, продължителност на периода/периодите на експозиция и температура(и) на експозиция;
- Подробна информация за използваната процедура за измиване след периода на експозиция;
- Брой кожни дискове, използвани за повторения на изпитван химикал и контроли (положителни и отрицателни контроли);
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- препратка към данни за модела от предишни изпитвания; това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) Приемливост на стойностите на TER (в k Ω) на положителната и отрицателната контрола с препратка към съответните им диапазони на съпротивление
 - ii) Приемливост на съдържанието на оцветител (в μg /диск) на положителната и отрицателната контрола с препратка към съответните им диапазони на съдържание на оцветител
 - iii) Приемливост на резултатите от изпитванията с препратка към изменчивостта при повторенията на кожни дискове от предишни периоди

- Описание на приложените критерии за вземане на решение/модел за прогнозиране.

Резултати:

- Представяне в табличен вид на данните от изпитването с измерване на TER и фиксиране на оцветител (ако е провеждано) за отделните изпитвани химикали и контроли, за всяка проведена изпитвателна серия (експеримент) и всяко повторение на кожен диск (за отделните животни и отделните кожни проби), средни стойности, стандартни отклонения (SD) и коефициенти на вариация (CV);
- Описание на всички наблюдавани ефекти;
- Получената класификация по отношение на използвания модел за прогнозиране/критериите за вземане на решение.

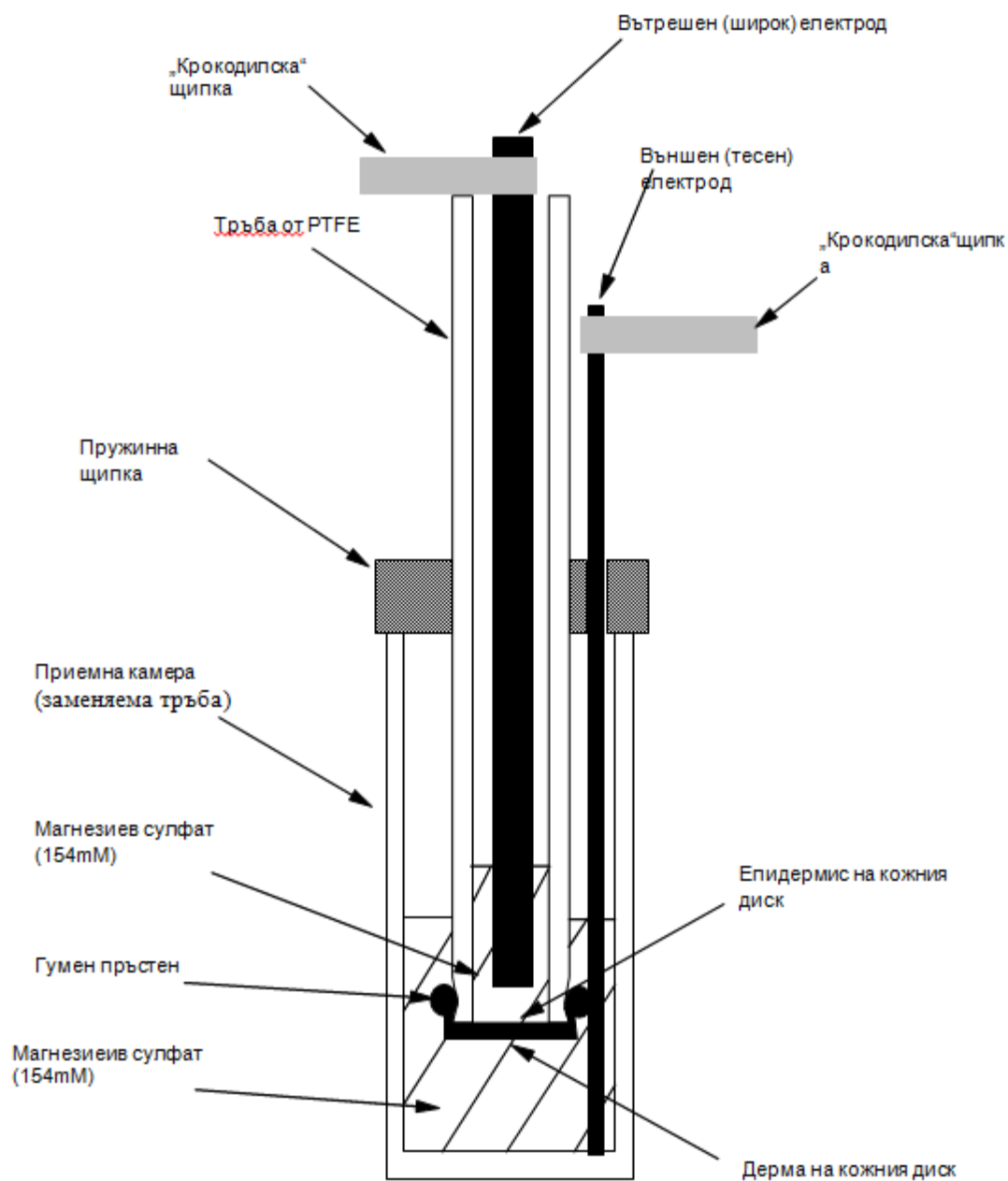
Обсъждане на резултатите

Заклучения

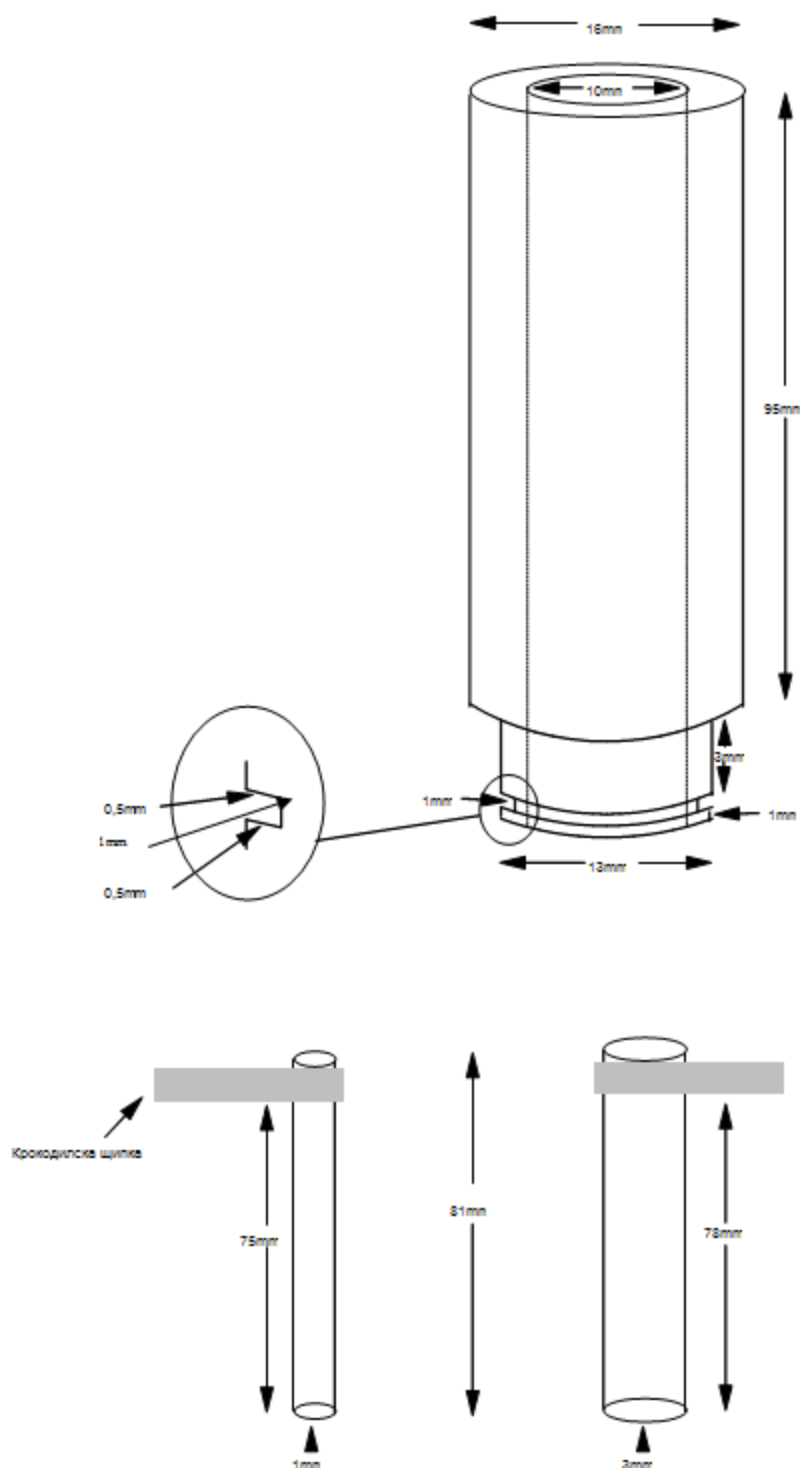
ЛИТЕРАТУРА

- (2) Глава Б.4 от настоящото Приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху кожата.
- (3) Глава Б.40bis настоящото Приложение, *In Vitro* кожен модел.
- (4) Глава Б.65 от настоящото Приложение, *In Vitro* Метод за изпитване с мембранна бариера.
- (5) Глава Б.46 настоящото Приложение, *In Vitro* кожно дразнене: Метод за изпитване на реконструиран човешки епидермис.
- (14)

ФИГУРА 1: ОПИТНА ПОСТАНОВКА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗМЕРВАНЕ НА TER ВЪРХУ КОЖА ОТ ПЛЪХОВЕ



ФИГУРА 2: РАЗМЕРИ НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ ТРЪБИ ОТ ПОЛИТЕТРАФЛУОРОЕТИЛЕН (PTFE) И ПРИЕМНИТЕ ТРЪБИ И ЕЛЕКТРОДИ



Особено важни параметри на опитната постановка, показана по-горе:

- вътрешният диаметър на политетрафлуороетиленовата тръба,

- дължината на електродите спрямо политетрафлуороетиленовата тръба и приемната тръба, така че кожният диск да не бъде докосван от електродите, и при стандартната си дължина електродът да контактува с разтвора на MgSO_4 ,
- количеството на разтвора на MgSO_4 в приемната тръба трябва да осигурява достатъчна дълбочина на течността спрямо нивото в политетрафлуороетиленовата тръба, както е показано на фигура 1,
- кожният диск трябва да бъде достатъчно добре прикрепен към политетрафлуороетиленовата тръба, така че електрическото съпротивление да бъде достоверна мярка за свойствата на кожата.

Допълнение

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи делът на верните резултати при даден метод за изпитване (20).

С: Корозивен.

Химикал: Вещество или смес.

Съответствие: Мярка за ефективността на метода за изпитване за методи, които дават категоричен резултат и е един от аспектите на приложимостта му. Терминът понякога се използва взаимозаменяемо с термина „точност“ и се определя като делът на всички изпитани химикали, които са правилно класифицирани като положителни или отрицателни. Съответствието зависи изключително от преобладаването на положителните контроли сред типовете на текущо изпитвания химикал (20).

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали) на ООН: система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

IATA: Интегриран подход към изпитването и оценката.

Смес: смес или разтвор, съставен от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

NC: Некорозивен.

OD: Оптична плътност.

PC: Положителна контрола, повторение, съдържащо всички компоненти на дадена

изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Стандарти за ефективност (СЕ): стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който по своя механизъм и функционално е сходен с валидирания метод. Включени са: i) съществени компоненти на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтни химикали, подбрани между химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива на надеждност и точност, въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали.

Относителност: Описание на взаимовръзката между метода на изпитване и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (20).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (20).

Чувствителност: Относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (20).

Корозивно действие върху кожата *in vivo*: Причиняването на необратимо увреждане на кожата; а именно видима некроза през епидермиса и в дермата след прилагане на изпитван химикал в течение на не повече от 4 часа. Характерните прояви на корозивно действие включват язви, кървене, кървави струпеи, а до края на 14-дневния период на наблюдение се появява обезцветяване, предизвикано от избледняване на кожата, области с пълна алопеция и цикатрикси. Хистопатологията трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните увреждания.

Специфичност: Относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (20).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всякакви добавки, необходими за запазване на стабилността му, както и всякакви онечиствания, произтичащи от използваната технология, но с изключение на разтворители, които могат да бъдат

отделени, без да се засегне стабилността на веществото или да се промени съставът му.

(Изпитвателна) серия: Един химикал, изпитван паралелно чрез минимум три кожни диска за повторения.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Транскутанно електрическото съпротивление (TER): е мярка за електрическия импеданс на кожата, като стойност на съпротивлението, изразена в килоомове. Един прост и сигурен метод за оценка на бариерната функция чрез регистриране на преминаването на йони през кожата с помощта на измервателния мост на Уитстоун.

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали. “

(6) В Част Б глава Б.40bis се заменя със следното:

„Б.40bis IN VITRO корозивно действие върху кожата: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМИС (RhE)

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 431 (2016). Корозивното действие върху кожата се разбира като причиняване на необратимо увреждане на кожата, проявяващо се като видима некроза през *епидермиса* и в *дермата*, настъпило след прилагане на изпитван химикал [както е дефиниран от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетиране на химикали (GHS) на Обединените нации (ООН) (1) и Регламент на Европейския съюз (ЕС) 1272/2008 относно класификацията, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP)¹]. Настоящият актуализиран метод за изпитване Б.40bis осигурява процедура *in vitro*, позволяваща идентификацията на некорозивни и корозивни вещества и смеси в съответствие с GHS на ООН и CLP. Освен това позволява частична подкатегоризация на корозивните вещества.
2. Оценяването на потенциала за корозивно действие върху кожата на химикалите обикновено включва използване на лабораторни животни (МИ Б.4, еквивалентен на ОИСП TG 404; първоначално приет през 1981 г. и ревизиран през 1992 г., 2002 г. и 2015 г.) (2). В допълнение към настоящия МИ Б.40bis, бяха валидирани и приети два други *in vitro* метода за изпитване на потенциал за кожна корозия на химикали под формата на МИ Б.40 (еквивалентен на ОИСП TG 430) (3) и МИ Б.65 (еквивалентен на ОИСП TG 435) (4). Освен това бе приет *in vitro* МИ Б.46 (еквивалентен на ОИСП TG 439) (5) за изпитване на потенциала за дразнене на кожата. Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи към изпитването и оценката (IATA) на корозивното и дразнещо действие върху кожата описва няколко модула, които обединяват източници на информация и инструменти за анализ, и предоставя насоки за i) как да се интегрират и използват съществуващите данни за изпитвания и различни от тези за изпитвания за оценката на потенциала на химикалите за дразнене на кожата и за корозивно действие върху кожата, и ii) предлага подход, когато е необходимо по-нататъшно изпитване (6).

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

3. Настоящият метод за изпитване разглежда корозивното действие върху кожата по отношение на човешкото здраве (крайна точка). В него се използва реконструиран човешки *епидермис* (RhE) (получен от нетрансформирани епидермални кератиноцити, извлечени от човек), който е почти идентичен с хистологичните, морфологичните, биохимичните и физиологичните свойства на горните части на човешката кожа, *т.е. епидермиса*. Съответните насоки за изпитване на ОИСП бяха първоначално приети през 2004 г. и актуализирани през 2013 г., за да включват допълнителни методи за изпитване, използващи моделите с RhE и възможността за използване на методите за подкатегоризация на корозивни химикали, и бяха актуализирани през 2015 г., за да включват препратка към ръководството на IATA и да се въведе употребата на алтернативна процедура за измерване на жизнеспособността.
4. В този метод за изпитване са включени четири валидирани налични в търговската мрежа модела с RhE. Предварителните изследвания за валидиране (7), последвани от официално изследване за валидиране за оценка на корозивното действие върху кожата (8)(9)(10) бяха проведени (11) (12) за два от горните налични в търговската мрежа модела за изпитване, Стандартния модел (СМ) EpiSkin™ и Теста за кожна корозивност (ТКК) EpiDerm™ (EPI-200) (наричани по-долу в текста „валидирани референтни методи“ – VRM). Резултатите от тези изследвания дадоха основание за препоръката, че двата гореспоменати VRM биха могли да се използват за регулаторни цели, за разграничаване на корозивните (C) от некорозивните (NC) вещества и, че EpiSkin™ би могъл да се използва и в подкрепа на подкатегоризацията на корозивните вещества(13)(14)(15). Съгласно валидация на основата на CE (16)(17)(18) два други налични в търговската мрежа *in vitro* модела за изпитване за корозивно действие върху кожата, използващи RhE, показаха резултати, сходни с тези на EpiDerm™ VRM. Това са SkinEthic™ RHE¹ и epiCS® (наричан по-рано EST-1000), които също могат да бъдат използвани за регулаторни цели за разграничаване на корозивни от некорозивни вещества (19)(20). Пост-валидационните изследвания, проведени от производителите на модела с RhE от 2012 г. до 2014 г. с оптимизиран протокол за коригиране на интерференции от неспецифично намаляване на МТТ от изпитваните химикали, подобриха ефективността както на разграничаването на C/NC, така и подкрепиха подкатегоризацията на корозивните вещества (21)(22). Бяха извършени допълнителни статистически анализи на пост-валидационните данни, генерирани с помощта на EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE

¹ Съкращението RhE (=реконструиран човешки епидермис) се използва за всички модели, базирани на технологията и използване на RhE. Съкращението RHE, използвано съвместно с модела SkinEthic™ означава същото, но като част от името на този специфичен метод за изпитване, предлаган на пазара, се пише изцяло с главни букви.

и EpiCS®, за да се идентифицират алтернативни модели за прогнозиране, които подобриха способността за прогнозиране при подкатегоризация (23).

5. Преди предложеният подобен или модифициран *in vitro* метод за изпитване с използване на RhE за корозивно действие върху кожата, различен от VRM, да може да бъде използван за регулаторни цели, следва да се определи неговата надеждност, относимост (точност) и ограничения за предложената употреба, за да се осигури неговото сходство с VRM, в съответствие с изискванията на Стандартите за ефективност (СЕ) (24) установени в съответствие с принципите на ръководство на ОИСП № 34 (25). Взаимното приемане на данни се гарантира само след като всеки предложен нов или актуализиран метод за изпитване, съответстващ на СЕ, е бил разгледан и включен в съответните насоки за изпитване. Моделите за изпитване, включени в настоящите насоки за изпитване, могат да се използват, за да се работи по изискванията на държавите за резултати от изпитвания при *in vitro* метод за изпитване на корозивно действие върху кожата, като същевременно се извличат ползи от предимствата на взаимното приемане на данни.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. Настоящият метод за изпитване позволява идентификацията на некорозивни и корозивни вещества и смеси в съответствие с GHS на ООН и CLP. Освен това този метод за изпитване подкрепя подкатегоризацията на корозивните вещества и смеси в незадължителната подкатегория 1A в съответствие с GHS на ООН (1), както и като комбинация на подкатегориите 1B и 1C (21)(22)(23). При този метод за изпитване съществува ограничението, че не е възможно разграничаване между подкатегориите 1B и 1C корозивно действие за кожата в съответствие с GHS на ООН и CLP, поради ограничения набор от добре известни *in vivo* корозивни химикали от подкатегория 1C. Моделите за изпитване EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE и epiCS® могат да определят подкатегории (т.е. 1A спрямо 1B и 1C спрямо NC)
8. В рамките на валидирането в подкрепа на моделите за изпитване, включени в настоящия метод за изпитване, са изпитани широк обхват от химикали, представляващи основно отделни вещества, в случаите, когато методите се използват за идентифициране на некорозивни и корозивни вещества; емпиричната база данни от изследването за валидиране обхваща 60 химикала, покриващи широк кръг от химични класове (8)(9)(10). Изпитването за демонстриране на чувствителност, специфичност, точност и възпроизводимост в рамките на лабораторията на изследването за подкатегоризация бе извършено от разработчиците на метода за изпитване, а резултатите бяха прегледани от ОИСП (21) (22) (23). Въз основа на цялостните налични данни, методът за изпитване е

приложим за широк диапазон от химични класове и агрегатни състояния, включително течности, полутвърди и твърди вещества и восъци. Течностите могат да бъдат или да не бъдат водни разтвори; твърдите вещества може да са разтворими или неразтворими във вода. Когато е възможно, твърдите вещества следва да бъдат смилани до фин прах преди прилагане; не се изисква друга предварителна обработка на пробата. Когато може да се докаже, че моделите за изпитване, включени в настоящия метод за изпитване по отношение на конкретна категория изпитвани химикали не са приложими, те не трябва да се използват за тази конкретна категория изпитвани химикали. В допълнение, настоящият метод за изпитване се приема за приложим към смеси като разширение на неговата приложимост за вещества. Въпреки това обаче, поради факта, че смесите покриват широк спектър категории и състави и, че понастоящем има налична само ограничена информация по отношение на изпитването на смеси, в случаите, когато с доказателство може да се демонстрира неприложимостта на метода за изпитване към специфична категория смеси (*напр.* съгласно стратегия, предложена в 26)), методът на изпитване не следва да се използва за тази специфична категория смеси. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобно разглеждане не е необходимо, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Газовете и аерозолите все още не са оценени с изследване за валидиране (8)(9)(10). Макар да се предполага, че те могат да бъдат изпитвани, като се използва технологията с използване на RhE, настоящият метод не дава възможност за изпитване на газове и аерозоли.

9. Изпитваните химикали, поглъщащи светлината в същия диапазон като МТТ формаза, и изпитваните химикали, които могат пряко да редуцират виталния оцветител МТТ (до МТТ формаза) могат да попречат на измерванията на жизнеспособността на тъканта и изискват употреба на адаптирани контроли за корекция. Типът на адаптираните контроли, които може да са необходими, варира в зависимост от типа интерференция, предизвикана от изпитвания химикал, и използваната процедура за измерване на МТТ формаза (вж. точки 25-31).
10. Тъй като методът за изпитване не осигурява адекватна информация за дразненето на кожата, следва да се отбележи, че МИ Б.46 специално разглежда въздействието върху здравето дразненето на кожата *in vitro* и се базира на същата система за изпитване с използване на RhE, макар и използваща друг протокол (5). За пълна оценка на локалното кожно въздействие след еднократна дермална експозиция следва да се направи справка с Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи за изпитване и оценка (6). Този съобразен с IATA подход включва провеждането на изпитвания *in vitro* за корозивно действие върху кожата (като описаните в настоящия метод за изпитване) и за дразнене на кожата, преди да се обсъжда изпитване върху живи животни. Признава се, че използването на човешка кожа е предмет на национални и международни етични съображения и условия.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Изпитваният химикал се прилага локално върху триизмерен RhE модел, състоящ се от нетрансформирани епидермални кератиноцити, извлечени от човек, които са били култивирани, за да образуват многослоен, високодиференциран модел на човешкия *епидермис*. Той се състои от организирани базален, шипчест и зърнест слой, както и многослоен *stratum corneum*, съдържащ междуклетъчни ламелни липидни слоеве, представляващи основните липидни класове, аналогични на онези, които се наблюдават *in vivo*.
12. Методът за изпитване с използване на RhE е базиран на предположението, че корозивните химикали могат да проникнат през *stratum corneum* чрез дифузия или ерозия и са цитотоксични към клетките в подлежащите слоеве. Клетъчната жизнеспособност се измерва чрез ензимно превръщане на виталния оцветител МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенилтетразолиев бромид, тиазолил син тиазолиев бромид, CAS номер 298-93-1], в синя формазанова сол, която се измерва количествено след екстракция от тъканите (27). Корозивните химикали се определят по способността им да намаляват клетъчната жизнеспособност под определени прагови нива (вж. точки 35 и 36). Базираният на RhE метод за изпитване за корозивно действие върху кожата показва, че с него може да се правят прогнози за въздействието *in vivo* на корозивното действие върху кожата, оценявано при зайци, съгласно МИ Б.4 (2).

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

13. Преди рутинното използване на който и да било от четирите валидирани модели за изпитване с използване на RhE, които се придържат към настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническа компетентност, като класифицират дванадесетте опитни вещества, посочени в таблица 1. В случай на използване на метод за подкласификация, следва да се докаже и правилната подкатегоризация. При ситуации, в които дадено вписано вещество не е налично или когато е обосновано, може да се използва друго вещество, за което има налични адекватни *in vivo* и *in vitro* справочни данни (напр. от списъка на референтните химикали (24)), при условие че се прилагат същите критерии за избор, както описаните в таблица 1.

Таблица 1: Списък на веществата за изпитване за пригодност¹

Вещество	CASRN	Химичен клас ²	Кат. по GHS на ООН/CLP на базата на <i>In Vivo</i>	VRM Кат. на базата на <i>In Vitro</i> резултати ⁴	МТТ Редуктор ⁵	Агрегатно състояние на материала
Подкатегория 1A <i>In Vivo</i> корозивни вещества						
Бромоцетна киселина	79-08-3	Органична	1A	(3) 1A	--	S
Борен трифлуорид дихидрат	13319-75-0	Неорганична киселина	1A	(3) 1A	--	L

Фенол	108-95-2	Фенол	1A	(3) 1A	--	S
Дихлорацетил хлорид	79-36-7	Електрофил	1A	(3) 1A	--	L
Комбинация от подкатегории 1B и 1C <i>In Vivo</i> корозивни вещества						
Глиоксилова киселина, монохидрат	563-96-2	Органична киселина	1B и 1C	(3) 1B и 1C	--	S
Млечна киселина	598-82-3	Органична	1B и 1C	(3) 1B и 1C	--	L
Етаноламин	141-43-5	Органична основа	1B	(3) 1B и 1C	Y	Вискозна
солна киселина (14.4%)	7647-01-0	Неорганична киселина	1B и 1C	(3) 1B и 1C	--	L
<i>In Vivo</i> некорозивни вещества						
Фенетил бромид	103-63-9	Електрофил	NC	(3) NC	Y	L
4-амино-1,2,4-триазол	584-13-4	Органична основа	NC	(3) NC	--	S
4-(метилтио)-бензалдехид	3446-89-7	Електрофил	NC	(3) NC	Y	L
Лауринова киселина	143-07-7	Органична киселина	NC	(3) NC	--	S

Съкращения: CASRN = Номер в регистъра на Химическата реферативна служба; VRM = Валидиран референтен метод; NC = некорозивно

¹ Опитните вещества, разделени първо на корозивни и некорозивни, сортирани след това по подкатегория на корозивност и накрая по химичен клас, бяха избрани от веществата, използвани при изследванията за валидиране на ECVAM EpiSkin™ и EpiDerm™ (8) (9) (10), и при изследванията след валидиране на базата на данни, предоставени от разработчиците на EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ и epiCS® (23). Освен ако нямаше други указания, веществата бяха изпитвани при нивото на чистота, което са имали при купуването им от търговския източник (8) (10). Подборът включва, доколкото е възможно, вещества, които: i) са представителни за диапазона на реакции на корозивност (напр. некорозивни; слабо до силно корозивни вещества), които могат да се измерят или прогнозираят с помощта на VRM; ii) са представителни са химичните класове, използвани във изследванията за валидиране; iii) имат химически структури, които са добре определени; iv) предизвикват възпроизводими резултати при VRM; v) предизвикват окончателни резултати в референтния метод за *in vivo* изпитване; vi) се предлагат в търговската мрежа; и vii) не са свързани с прекалено високи разходи за утилизация.

² Химичен клас, определен от Barratt *et al.* (8).

³ Съответстващите групи за опаковане на ООН са I, II и III, респективно за 1A, 1B и 1C от GHS на ООН/CLP.

⁴ Прогнозите от VRM *in vitro*, докладвани в тази таблица, са получени с помощта на моделите за изпитване EpiSkin™ и EpiDerm™ (VRM) по време на изследването след валидиране, проведено от разработчиците на метода за изпитване.

⁵ Стойностите за жизнеспособността, получени в рамките на изследванията за валидиране на ECVAM за корозивно действие върху кожата, не бяха коригирани за пряка редукция на MTT (при изследванията за валидиране не бяха убивани контроли). Въпреки това, поствалидационните данни, генерирани от разработчиците на метода за изпитване, които са представени в тази таблица, бяха получени с адаптирани контроли (23).

14. Като част от процедурата за доказване на компетентност е препоръчително потребителят да провери бариерните свойства на тъканите след получаване, както е посочено от производителя на RhE модела. Това е особено важно, ако тъканите са били превозвани на дълго разстояние или в продължение на дълги периоди от време. След като даден метод за изпитване е бил успешно създаден и компетентността при употребата му – доказана, обикновено такава проверка не би била необходима. Все пак, при редовното използване

на даден метод за изпитване, е препоръчително да се продължи с оценяването на бариерните свойства на редовни интервали.

ПРОЦЕДУРА

15. Следва обобщено описание на компонентите и процедурите на моделите за изпитване с използване на RhE за оценка на корозивно действие върху кожата, обхванати от настоящия метод за изпитване. Одобрените като научно валидни модели с употреба на RhE за използване с настоящия метод за изпитване, *т.е.* моделите EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE и epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), могат да се набавят от търговската мрежа. За тези четири RhE модела има налични Стандартни оперативни процедури (SOP) (34)(35)(36)(37), а техните основни компоненти на метода за изпитване са обобщени в допълнение 2. При осъществяване и използване на някой от тези модели в лабораторни условия е препоръчително да се направи справка в съответните SOP. Изпитвания с помощта на четирите модела за изпитване с използване на RhE, обхванати от настоящия метод за изпитване, следва да изпълняват следните условия:

КОМПОНЕНТИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА RHE

Общи условия

16. За реконструирането на епитела следва да се използват нетрансформирани човешки кератиноцити. Под функционалния *stratum corneum* трябва да има множество слоеве от жизнеспособни епителни клетки (базален слой, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). Роговият слой *stratum corneum* следва да бъде многослоен и да съдържа основния липиден профил, за да се създаде функционална бариера, която да е устойчива на бързо проникване на цитотоксични химикали за сравнение, *напр.* натриев додецил сулфат (SDS) или Triton X-100. Бариерната функция следва да бъде доказана и може да бъде оценена или чрез определяне на концентрацията, при която химикал за сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50 % (IC₅₀) след определено време на експозиция, или чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50 % (ET₅₀) при прилагане на химичния маркер с определена, фиксирана концентрация (вж. точка 18). Задържащите свойства на модела на RhE следва да предотвратяват преминаването на материал около *stratum corneum* към жизнеспособната тъкан, което би довело до неадекватно моделиране на експозицията на кожата. Моделът на RhE следва да не е заразен с бактерии, вируси, микоплазма или гъбички.

Функционални условия

Жизнеспособност

17. Използваното изпитване за количествено определяне на жизнеспособността на тъканта е изпитването с МТТ (27). Жизнеспособните клетки на тъканния модел от RhE редуцират виталния оцветител МТТ в син формазаанов преципитат на МТТ, който след това се извлича от тъканта с помощта на изопропанол (или подобен разтворител). Оптичната плътност (OD) само на разтворителя, използван за екстракцията, следва да бъде достатъчно ниска, т.е., $OD < 0,1$. Извлеченият МТТ формазаан може да се определи количествено с помощта или на стандартно измерване на поглъщане (OD), или чрез спектрофотометрична процедура с ВЕТХ/УВЕТХ (38). Ползвателите на модела с използване на RhE следва да гарантират, че всяка използвана партида от модела с използване на RhE отговаря на определените критерии за отрицателната контрола. Разработчикът/доставчикът на модела с използване на RhE следва да определи интервал на приемливост (горна и долна граница) за стойностите на OD на отрицателната контрола. Интервалите на приемливост за стойностите на OD на отрицателната контрола за четирите валидирани модели на изпитване с използване на RhE, включени в настоящия метод за изпитване, са дадени в таблица 2. Ползвателят на спектрофотометрия с ВЕТХ/УВЕТХ следва да използва интервалите за OD на отрицателните контроли, посочени в таблица 2, като критерий за приемливост за отрицателната контрола. Следва да се документира, че тъканите, третирани с отрицателната контрола, са стабилни като култура (дават сходни измервания за OD) за периода на продължителност на експозицията.

Таблица 2: Допустим размах на стойностите на OD на отрицателната контрола за контролиране на качеството на партидата

	Долна граница на	Горна граница на
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Барьерна функция

18. Роговият слой *stratum corneum* и липидният му състав следва да бъдат достатъчни за да устоят на бързото проникване на някои цитотоксични химикали за сравнение (*напр.* SDS или Triton X-100), оценено с IC_{50} или ET_{50} (таблица 3). Барьерната функция на всяка партида от използвания RhE модел следва да бъде доказана от разработчика/доставчика на RhE модела при доставяне на тъканите на крайния ползвател (вж. точка 21).

Морфология

19. Следва да бъде проведено хистологично изследване на модела на RhE, за да се докаже наличието на структура, подобна на многослойният човешки *епидермис*, съдържаща *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* и *stratum corneum* и показваща

липиден профил сходен с липидния профил на човешки епидермис. При доставяне на тъканите на крайния ползвател (вж. точка 21), разработчикът/доставчикът на RhE модела следва да предостави хистологично изследване на всяка партида от използвания RhE модел, доказващо подходящата морфология на тъканите.

Възпроизводимост

20. Ползвателите на метода за изпитване следва да докажат възпроизводимостта на методите за изпитване във времето с помощта на положителните и отрицателни контроли. Освен това методът за изпитване следва да се използва само ако разработчикът/доставчикът на RhE модела предостави данни, доказващи възпроизводимостта във времето като използва корозивни и некорозивни химикали *напр.* от списъка на Опитните вещества (таблица 1). В случай на използване на метод за изпитване за под-категоризация, възпроизводимостта по отношение на под-категоризацията също следва да бъде доказана.

Контрол на качеството (КК)

21. Моделът с RhE следва да бъде използван, само ако разработчикът/доставчикът докаже, че всяка използвана партида от модела с RhE отговаря на определените критерии за пускане в обращение на продукцията, сред които най-значими са тези за *жизнеспособността* (точка 17), *бариерната функция* (точка 18) и *морфологията* (точка 19). Тези данни се предоставят на ползвателите на метода за изпитване, така че те да могат да включат тази информация в протокола от изпитването. За надеждно прогнозиране на класификацията на корозивните вещества могат да се приемат само резултати, получени с тъканни приети от КК. Разработчикът/доставчикът на модела на RhE е определил интервал на приемливост (горна и долна граница) за стойностите на IC₅₀ или ET₅₀. Интервалите на приемливост за четирите валидирани модела на изпитване са даден в таблица 3.

Таблица 3: Критерии за КК за пускане в обращение на партида

	Долна граница на	Горна граница на
EpiSkin™ (SM) (18 часово третиране с SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 часа	ET ₅₀ = 8,7 часа
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 часа	ET ₅₀ = 10,0 часа
epiCS® (1% Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 часа	ET ₅₀ = 7,0 часа

Прилагане на изпитвания химикал и химикалите за контроли

22. За всеки изпитван химикал и за контролите за всяко време на експозиция следва да се използват най-малко две тъканни повторения. За течни, както и за твърди химикали, следва да се прилага достатъчно количество от изпитвания химикал за равномерно покриване на цялата повърхност на епидермиса, като същевременно се избягва прилагане на изобилна доза, *т.е.* следва да се използват минимум $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ или $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$. В зависимост от моделите, повърхността на епидермиса следва да се навлажни с дейонизирана вода, преди прилагане на твърди химикали, за да се подобри контактът между изпитвания химикал и повърхността на епидермиса (34)(35)(36)(37). Когато е възможно, твърдите вещества следва да се изпитват под формата на фин прах. Методът за приложение следва да бъде подходящ за конкретния изпитван химикал (вж. *напр.* препратки (34-37)). В края на периода за експозиция изпитваният химикал следва внимателно да бъде отмит от *епидермиса* с буферен воден разтвор или 0,9% NaCl. В зависимост от това, кой от четирите валидирани модела за изпитване с използване на RhE се използва, за всеки изпитван химикал се прилагат два или три периода на експозиция (за всичките четири валидни модела с използване на RhE : 3 минути и 1 час; за EpiSkinTM допълнително време за експозиция от 4 часа). В зависимост от използвания модел за изпитване с използване на RhE и оценявания период на експозиция, температурата на инкубация по време на експозиция може да варира между стайна температура и 37°C .
23. Във всяка изпитвателна серия следва да се използват паралелни отрицателни и положителни контроли (ПК), за да се докаже, че жизнеспособността (с отрицателни контроли), бариерната функция и получената чувствителност (с ПК) на тъканите са в рамките на допустим размах, определен от предходни периоди. Предложените химикали за положителна контрола са ледена оцетна киселина или 8N KOH, в зависимост от използвания модел с използване на RhE. Следва да се отбележи, че 8N KOH е пряк редуктор на МТТ, който може да изисква адаптирани контроли, както са описани в точки 25 и 26. Предложените отрицателни контроли са 0,9% (w/v) NaCl или вода.

Измервания на клетъчната жизнеспособност

24. Изследването с МТТ, което е количествено изследване, следва да се използва за измерване на клетъчната жизнеспособност съгласно настоящия метод за изпитване (27). Тъканната проба се поставя в разтвор на МТТ с подходяща концентрация (0,3 или 1 mg/ml) за 3 часа. След това от тъканта се извлича получения преципитиран син формаза с помощта на разтворител (*напр.* изопропанол, киселинен изопропанол), като концентрацията на формаза се измерва, като се определи OD при 570 nm с помощта на филтър с максимален обхват на пропускане $\pm 30 \text{ nm}$ или с спектрофотометрична процедура с ВЕТХ/УВЕТХ (вж. точки 30 и 31)(38).
25. Изпитваните химикали може да повлияят върху изпитването с МТТ чрез пряка редукция на МТТ до син формаза и/или чрез цветова интерференция, ако изпитваният химикал поглъща, естествено или в резултат от процедурите за третиране, в диапазона на OD на

формаза (570 ± 30 nm, основно химикали със син и пурпурен цвят). Следва да се използват допълнителни контроли, за да се открие и коригира евентуалната интерференция от тези изпитвани химикали, като например контрола за неспецифична редукция на МТТ (NSMTT) и контрола за неспецифичен цвят (NSC) (вж. точки 26 до 30). Това е особено важно, когато специфичен изпитван химикал не бъде напълно отстранен от тъканта чрез изплакване или когато проникне в *епидермиса*, и поради това присъства в тъканите, когато се изпълнява изпитването за жизнеспособност с МТТ. Подробно описание на това как се коригира пряката редукция на МТТ и интерференциите от оцветителите е налично с SOP за моделите на изпитване (34)(35)(36)(37).

26. За да се идентифицират преките редуктори на МТТ, всеки изпитван химикал следва да бъде добавен към прясно приготвена среда с МТТ (34) (35) (36) (37). Ако сместа с МТТ, съдържаща изпитвания химикал, стане синя/пурпурна, се приема, че изпитваният химикал пряко редуцира МТТ, като следва да се извърши допълнителна функционална проверка на нежизнеспособен епидермис, независимо от използването на стандартното измерване на поглъщането (OD) или спектрофотометрична процедура с BETX/УВЕТХ. При тази допълнителна функционална проверка се използват умъртвени тъкани, които имат единствено остатъчна метаболитна активност, но поглъщат количества от изпитвания химикал, сходни с тези на жизнеспособните тъкани. Всеки химикал, редуциращ МТТ, се прилага върху поне две умъртвени тъканни повторения за всяко време за експозиция, които биват подложени на цялото изпитване за корозивно действие върху кожата. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта, като от процента на жизнеспособността на тъканта, получен за живи тъкани, изложени на въздействието на редуктор на МТТ, се извади процентът неспецифична редукция на МТТ, получен за умъртвени тъкани, изложени на същия редуктор на МТТ, изчислен във връзка със серията с отрицателна контрола, изпълнено паралелно с изпитването, което се коригира (%NSMTT).
27. За да се установи евентуалната интерференция чрез оцветени изпитвани химикали или изпитвани химикали, които са се оцветили при контакт с вода или изопропанол, и за да се вземе решение относно необходимостта от допълнителни контроли, трябва да се извърши спектрален анализ на изпитвания химикал във вода (средата по време на експозиция) и/или изопропанол (разтворът за извличане). Ако изпитваният химикал във вода и/или изопропанол поглъща светлина в диапазона от 570 ± 30 nm, следва да бъдат извършени допълнителни контроли за оцветителя или като алтернатива следва да бъде изпълнена спектрофотометрична процедура с BETX/УВЕТХ, като в този случай контролите не са необходими (вж. точки 30 и 31). Когато се извършва стандартното измерване на поглъщането (OD), всеки оцветен изпитван химикал, причиняващ интерференция, се прилага върху най-малко две повторения от жизнеспособни тъкани за всяко време на експозиция, които биват подложени на цялото изпитване за корозивно действие върху кожата, но по време на етапа за инкубация с МТТ се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ, за да се получи контрола на неспецифичен цвят (NSC_{living}). Контролата

NSC_{living} трябва да се изпълни паралелно за всяко време на експозиция, за всеки оцветен изпитван химикал (във всяка изпитвана серия) поради присъщото биологично разнообразие на живите тъкани. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта като от процента на жизнеспособността на тъканта, получен за живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, инкубирани с разтвор на МТТ, се извади процентът неспецифичен цвят, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, инкубирани със среда без МТТ, от изпитване, проведено паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{living}).

28. Изпитваните химикали, които се определят като причиняващи пряка редукция на МТТ (вж. точка 26) и цветна интерференция (вж. точка 27) също изискват трети набор от контроли, освен NSMTT и NSC_{living} контроли, описани в предходните точки, когато се изпълнява стандартното измерване на коефициента на поглъщане (OD). Обикновено такъв е случаят с тъмно оцветените изпитвани химикали, създаващи интерференция на изследването на МТТ (напр., син, пурпурен, черен), защото техният присъщ цвят пречи на оценката на тяхната способност пряко да редуцират МТТ, както е описано в точка 26. Тези изпитвани химикали могат да се свързват както с живи, така и с умъртвени тъкани и поради това, NSMTT контролът може не само да коригира потенциала за пряка редукция на МТТ на изпитвания химикал, но и цветната интерференция, произтичаща от свързването на изпитвания химикал с умъртвените тъкани. Това би могло да доведе до двойна корекция за цветна интерференция, тъй като контролът NSC_{living} вече коригира цветната интерференция, произтичаща от свързването на изпитвания химикал с живите тъкани. За да се избегне възможна двойна корекция за цветна интерференция трябва да се изпълни трети контрол за неспецифичен цвят в умъртвени тъкани (NSC_{killed}). При този допълнителен контрол, изпитваният химикал се прилага върху най-малко две умъртвени тъканни повторения за всяко време на експозиция, които биват подложени на цялата процедура за изпитване, но по време на етапа за инкубация с МТТ, се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ. Единичен NSC_{killed} контрол е достатъчен за всеки изпитван химикал, независимо от броя на изпълнените независими изпитвания/изпитвани серии, но трябва да се изпълнява паралелно с NSMTT контрола и, когато е възможно, с една и съща партида тъкани. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта като от процента на жизнеспособност на тъканта, получен за живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, се извадят %NSMTT и %NSC_{living} и се прибави процентът неспецифичен цвят, получен от умъртвени тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, инкубирани със среда без МТТ, изчислен във връзка със серията с отрицателна контрола, изпълнена паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{killed}).
29. Важно е да се отбележи, че неспецифичната редукция на МТТ и неспецифичната цветна интерференция може да повишат отчетените стойности на тъканния екстракт над обхвата на линейност на спектрофотометъра. Въз основа на това, всяка лаборатория следва да определи обхвата на линейност на своя спектрофотометър с помощта на МТТ формазан

(CAS # 57360-69-7), придобит от търговската мрежа, преди започване на изпитвания на изпитвани химикали за регулаторни цели. По-конкретно, измерването на стандартното измерване на поглъщането (OD) с помощта на спектрофотометър е подходящо за оценяване на преките редуктори на МТТ и изпитваните химикали, причиняващи цветна интерференция, когато оптичните плътности (OD) на тъканните екстракти, получени с изпитваните химикали без каквато и да било корекция за пряка редукция на МТТ и/или цветна интерференция, са в рамките на обхвата на линейност на спектрофотометъра или, когато некоригираният процент на жизнеспособност, получен с изпитвания химикал вече го е определил като корозивно вещество (вж. точки 35 и 36). Въпреки това, резултатите за изпитваните химикали, предизвикващи $\%NSMTT$ и/или $\%NSC_{liVing} > 50\%$ от отрицателната контрола следва да се приемат предпазливо.

30. По отношение на оцветените изпитвани химикали, които не са съвместими с измерването на стандартния коефициент на поглъщане (OD), поради твърде силна интерференция в изследването на МТТ, може да се приложи алтернативната BETX/UBETX спектрофотометрична процедура за измерване на МТТ формазана (вж. точка 31) (37). BETX/UBETX системата за спектрофотометрия позволява отделянето на МТТ формазана от изпитвания химикал преди количественото определяне (38). По тази причина, никога не се изискват NSC_{liVing} или NSC_{killed} контроли, когато се използва BETX/UBETX спектрофотометрия, независимо от химикала, който е подложен на изпитване. Независимо от това, ако има подозрения, че изпитваният химикал пряко редуцира МТТ или е с цвят, който пречи на оценката на способността за пряко редуциране на МТТ (както е описано в точка 26), следва да се използват контролите NSMTT. Когато се използва BETX/UBETX спектрофотометрия за измерване на МТТ формазан, процентът на жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на пиковата площ на МТТ формазан, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал спрямо пика на МТТ формазан, получен при паралелната отрицателна контрола. По отношение на изпитваните химикали, които могат пряко да редуцират МТТ, реалната жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал, минус $\%NSMTT$. И накрая следва да се отбележи, че преките редуктори на МТТ, които може да причиняват и цветна интерференция и, които се задържат в тъканите след третиране и толкова силно редуцират МТТ, че стават причина за невъзможност за оценяване на OD (при използване на стандартно измерване на OD) или на пикови площи (при използване на BETX/UBETX спектрофотометрия) на изпитваните екстракти от тъкани, които попадат извън обхвата на линейност на спектрофотометъра, въпреки че се очаква подобни случаи да възникват само в изключително редки ситуации.
31. BETX/UBETX спектрофотометрията може да се използва и с всички видове изпитвани химикали (оцветени, неоцветени, редуктори на МТТ и не-редуктори на МТТ) за измерване на МТТ формазан (38). Поради разнообразието на системите за BETX/UBETX спектрофотометрия, годността на системата за BETX/UBETX спектрофотометрия следва

да бъде доказана преди употребата ѝ за количествено определяне на МТТ формазан от тъканни екстракти, като се посочи изпълнението на критериите за приемане по отношение на набор от стандартни параметри, на базата на описаните в насоките на Администрацията по храни и лекарства на САЩ за индустрията по отношение на валидирането на био-аналитични методи (38)(39). Тези ключови параметри и критериите за приемането им са показани в допълнение 4. След като критериите за приемане, дефинирани в допълнение 4 са изпълнени, системата за ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия се разглежда като годна и готова за измерване на МТТ формазан при експерименталните условия, описани в настоящия метод за изпитване.

Критерии за приемливост

32. За всеки метод за изпитване, използващ валидни модели на RhE, третираните с отрицателна контрола тъкани следва да показват OD, отразяваща качеството на тъканите, както е описано в таблица 2 и не следва да бъдат под граничните стойности, установени в предишни периоди. Тъканите, третирани с ПК, *т.е.* ледена оцетна киселина или 8N KOH, следва да отразяват способността на тъканите да реагират на корозивен химикал при условията на модела на изпитване (вж. допълнение 2). Изменчивостта между тъканните повторения на изпитвания химикал и/или контролните химикали следва да попада в рамките на приетите лимити за изискванията за всеки валиден модел на RhE (вж. допълнение 2) (*напр.* разликата в жизнеспособността между две тъканни повторения не следва да превишава 30%). Ако отрицателната контрола или ПК, включени в серия, попаднат извън приетите обхвати, серията се разглежда като негодна и следва да бъде повторена. Ако изменчивостта на изпитваните химикали попадне извън определения обхват, изпитването следва да бъде повторено.

Интерпретация на резултатите и модел за прогнозиране

33. Стойностите за OD, получени за всеки изпитван химикал следва да се използват за изчисляване на процента на жизнеспособност спрямо отрицателната контрола, който е определен за 100%. В случай, че се използва ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия, процентът на жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на пиковата площ на МТТ формазан, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал спрямо пика на МТТ формазан, получен при паралелната отрицателна контрола. Граничните процентни стойности на клетъчна жизнеспособност, разграничаващи корозивен от не-корозивен изпитван химикал (или разграничаващи различните под-категории на корозивни вещества) са определени по-долу в точки 35 и 36 за всеки от моделите за изпитване, обхванати от настоящия метод за изпитване и следва да се използват за интерпретиране на резултатите.
34. Една изпитвателна серия, включваща поне две тъканни повторения, би следвало да е достатъчна за даден химикал, когато получената класификация е недвусмислена. При все това, при наличие на гранични резултати, каквито са несъгласуваните измервания на

повторения, следва да се разгледа възможността за повтаряне на серията, както и на трета серия, в случай на наличие на несъгласувани резултати между първите две серии.

35. Моделът за прогнозиране за метода за изпитване EpiSkin™ за корозивно действие върху кожата (9)(34)(22), свързан с класификационната система GHS на ООН/CLP, е даден в таблица 4:

Таблица 4: Модел за прогнозиране EpiSkin™

Жизнеспособност, измерена след времеви точки на експозиция (t=3, 60 и 240 минути)	Прогноза, която следва да се вземе под внимание
< 35% след 3-минутна експозиция	Корозивен: • незадължителна подкатегория 1A*
≥ 35% след 3-минутна експозиция И < 35% след 60-минутна експозиция ИЛИ ≥ 35% след 60-минутна експозиция И < 35% след 240-минутна експозиция	Корозивен: • Комбинация от незадължителни подкатегории 1B и 1C
≥ 35% след 240-минутна експозиция	Не-корозивен

*) Съгласно данните, генерирани предвид оценяването на полезността на моделите за изпитване с използване на RhE в подкрепа на подкатегоризацията, бе показано, че около 22 % от резултатите от подкатегория 1A от модела за изпитване EpiSkin™ може реално да представляват вещества/смеси от подкатегория 1B или подкатегория 1C (т.е. да е налице прекомерно класифициране) (вж. допълнение 3).

36. Моделите за прогнозиране за моделите за изпитване на корозивно действие върху кожата EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36) и epiCS® (16)(23)(37), свързани със системата за класифициране GHS на ООН /CLP, са показани в таблица 5:

Таблица 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE и epiCS®

Жизнеспособност, измерена след времеви точки на експозиция (t=3)	Прогноза, която следва да се вземе под внимание
СТЪПКА 1 за EpiDerm™ SCT, за SkinEthic™ RHE и epiCS®	
< 50% след 3-минутна експозиция	Корозивен
≥ 50% след 3-минутна експозиция И < 15% след 60-минутна експозиция	Корозивен
≥ 50% след 3-минутна експозиция И ≥ 15% след 60-минутна експозиция	Не-корозивен
СТЪПКА 2 за EpiDerm™ SCT – за вещества/смеси, идентифицирани като „корозивни“ в таблица 1	
< 25% след 3-минутна експозиция	Опционална под-категория 1A *
≥ 25% след 3-минутна експозиция	Комбинация от незадължителни подкатегории

СТЪПКА 2 за SkinEthic™ RHE – за вещества/смеси, идентифицирани като „корозивни“ в стъпка 1	
< 18% след 3-минутна експозиция	Незадължителна подкатегория 1A *
≥ 18% след 3-минутна експозиция	Комбинация от незадължителни подкатегории
СТЪПКА 2 за еpiCS® - за вещества/смеси, идентифицирани като Корозивни в стъпка 1	
< 15 % след 3-минутна експозиция	Незадължителна подкатегория 1A *
≥ 15 % след 3-минутна експозиция	Комбинация от незадължителни подкатегории

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

37. За всяко изпитване следва да се протоколират в таблица данните от отделните тъканни повторения (*напр.* стойностите за OD и изчисленият процент на клетъчна жизнеспособност за всеки изпитван химикал, включително класификацията), включително данните от повторените експерименти, според необходимостта. В допълнение следва да се протоколират средните стойности и обхватите на жизнеспособност и коефициентите на вариация (CVs) на различните тъканни повторения за всяко изпитване. Наблюдаваните взаимодействия между реагента на МТТ и преките редуктори на МТТ или оцветените изпитвани химикали следва да се протоколират за всеки изпитван химикал.

Протокол от изпитването

38. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал и контролни химикали:

- Вещество с една съставка: химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.;
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес: характеризирано, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките;
- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- източник, номер на партидата, при наличност;

- Обработка на изпитвания химикал/веществото за контроли преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна;
- Условия за съхранение.

Използван модел на RhE и протокол, и обосновка за него (ако е приложимо)

Условия на изпитване:

- Използван модел на RhE (включително партидният номер);
- Информация за калибриране на измервателното устройство (*напр.* спектрофотометър), използван филтър за дължина на вълната и лента на пропускане (ако е приложимо) за количествено определяне на МТТ формазан, и обхват на линейност на измервателното устройство;
- Описание на метода, използван за количествено определяне на МТТ формазан;
- Описание на квалификационните изисквания към системата за спектрофотометрия с ВЕТХ/УВЕТХ, ако е приложимо;
- пълна придружаваща информация за конкретния използван модел на RhE, включително качествените му показатели; това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) Жизнеспособност;
 - ii) Барьерна функция;
 - iii) Морфология;
 - iv) Възпроизводимост и способност за прогнозиране;
 - v) Контроли на качеството (КК) на модела;
- препратка към данни за модела от предишни изпитвания; Това следва да включва, но не се ограничава до
- приемливост на данните за КК по отношение на предходно установените партидни данни;
- Доказване на компетентност на изпълнение на метода за изпитване преди редовна употреба чрез изпитване на опитните вещества.

Процедура на изпитване:

- Подробни данни за използваната процедура на изпитване (включително използвани процедури за измиване след периода на експозиция);
- Дози на използвания изпитван химикал и контролни химикали;
- Продължителност на периода/периодите на експозиция и температура(и) на експозиция;

- Указание за използваните контроли за преки редуктори на МТТ и/или оцветяващи изпитвани химикали, ако е приложимо;
- Брой на използваните тъканни повторения за всеки изпитван химикал и контроли (ПК, отрицателна контрола и NSMTT, NSC_{living} и NSC_{killed}, ако е приложимо), за всяко време на експозиция;
- Описание на приложените критерии за вземане на решение/модел за прогнозиране на базата на използвания модел на RhE;
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване (включително процедурите за измиване).

Критерии за приемане на серия и изпитване:

- Средни стойности и допустим размах на положителна и отрицателна контрола на базата на данни от предходни периоди;
- Приемлива изменчивост между тъканните повторения за положителни и отрицателни контроли;
- Приемлива изменчивост между тъканните повторения за изпитвания химикал.

Резултати:

- Представяне в табличен вид на данните за отделните изпитвани химикали и контроли, за всеки период на експозиция, всяка изпитвателна серия и измерването на всяко повторение, включително OD или площта на пика на МТТ формаза, процента на жизнеспособност на тъканта, средния процент на жизнеспособност на тъканта, различията между повторенията, стандартните отклонения (SD) и/или коефициентите на вариация (CV), ако е приложимо;
- Ако е приложимо, резултатите от използваните контроли за преки редуктори на МТТ и/или оцветяващи изпитвани химикали, включително OD или пикова площ на МТТ формаза, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, разлики между тъканни повторения, стандартни отклонения (SD) и/или коефициенти на вариация (CV), (ако е приложимо), и окончателен коректен процент на жизнеспособност на тъканта;
- Резултатите, получени с изпитвания(-ите) химикал(и) и контролни химикали във връзка с определените критерии за приемане на изпитваната серия и изпитването;
- Описание на други наблюдавани ефекти;
- Получената класификация по отношение на използвания модел за прогнозиране/критериите за вземане на решение.

Обсъждане на резултатите

Заключения

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Глава Б.4 от настоящото Приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху кожата.
- (3) Глава Б.40 от настоящото Приложение, *In Vitro* корозивно действие върху кожата.
- (4) Глава Б.65 от настоящото Приложение, *In Vitro* Метод за изпитване с мембранна бариера.
- (5) Глава Б.46 настоящото Приложение, *In Vitro* кожно дразнене: Метод за изпитване на реконструиран човешки епидермис.
- (9) Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи делът на верните резултати при даден метод за изпитване (25).

Клетъчна жизнеспособност: Параметър, измерващ общата активност на клетъчна популация *напр.* като способността на клетъчните митохондриални дехидрогенази да редуцират виталния оцветител МТТ (3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенилтетразолиев бромид, Тиазолил синьо), който, в зависимост от измерената крайна точка и използваната тестова постановка, е свързан с общия брой и/или жизнеспособност на живите клетки.

Химикал: Вещество или смес.

Съответствие: Това е мярка за ефективността на метода за изпитване за методи, които дават категоричен резултат и е един аспект на приложимостта му. Терминът понякога се използва взаимозаменяемо с термина „точност“ и се определя като делът на всички изпитани химикали, които са правилно класифицирани като положителни или отрицателни. Съответствието зависи изключително от преобладаването на положителните контроли сред типовете на текущо изпитвания химикал (25).

ЕТ₅₀: Може да се оцени чрез определяне на необходимото време за експозиция за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50% при приложение на химикала за сравнение с определена фиксирана концентрация, вижте и IC₅₀.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали): Система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални

думи, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

BETX: Високоэффективна течна хроматография.

IATA: Интегриран подход към изпитването и оценката.

IC₅₀: Може да се оцени чрез определяне на концентрацията, при която химикалът за сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50% (IC₅₀) след фиксирано време за експозиция, вижте и ET₅₀.

Неопределена доза: Количеството изпитван химикал, приложено върху *епидермиса* превишаващо необходимото количество за пълно и равномерно покриване на повърхността на *епидермиса*. **Смес:** Смес или разтвор, съставен от две или повече вещества, при което те не реагират помежду си.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

МТТ: 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид; Тиазолил син тетразолиев бромид.

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация > 10% (w/w) и < 80% (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

NC: Некорозивен.

NSC_{kill}d контрол: Неспецифичен контрол на цвета в умъртвени тъкани.

NSC_{living} контрол : Неспецифичен контрол на цвета в живи тъкани.

NSMTT: Неспецифична редукция на МТТ.

OD: Оптична плътност

ПК: Положителна контрола, повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с химикал, за който е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Стандарти за ефективност (СЕ): стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който по своя механизъм и функционално е сходен с валидирания метод. Включени са: i) съществени компоненти на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтни химикали, избрани между химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (25).

Относимост: Описание на взаимовръзката между метода на изпитване и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (25).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (25).

Серия: Серията се обхваща един или повече изпитвани химикали, подложени на паралелно изпитване с отрицателни контроли и с ПК.

Чувствителност: Относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (25).

Корозивно действие върху кожата *in vivo*: Причиняването на необратимо увреждане на кожата; а именно видима некроза през *епидермиса* и в дермата след прилагане на изпитван химикал в течение на не повече от четири часа. Характерните прояви на корозивно действие включват язви, кръвене, а до края на 14-дневния период на наблюдение се появяват промени в цвета на кожата, области с пълна алопеция и cicatricies. Хистопатологията трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните увреждания.

Специфичност: Относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (25).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всякакви добавки, необходими за запазване на стабилността му, както и всякакви онечиствания, произтичащи от

използваната технология, но с изключение на разтворители, които могат да бъдат отделени, без да се засегне стабилността на веществото или да се промени съставът му.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

УВЕТХ: Ултра високоефективна течна хроматография.

UVСВ: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Допълнение 2

ОСНОВНИ КОМПОНЕНТИ НА МОДЕЛИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА RHE, ВАЛИДИРАНИ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ЗА КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ КОЖАТА

Компоненти на модела за изпитване	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Повърхност на модела	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Брой на тъканни повторения	Най-малко 2 за всяко време за експозиция	2-3 за всяко време за експозиция	Най-малко 2 за всяко време за експозиция	Най-малко 2 за всяко време за експозиция

Компоненти на модела за изпитване	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Дози за третиране и приложение	<u>Течности и вискозни вещества</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Твърди вещества</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5µl NaCl разтвор (9 g/l) <u>Восъкоподобни/лепкави</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) с найлонова мрежа	<u>Течности</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) с или без найлонова мрежа <i>Пред-изпитвателна съвместимост на изпитвания химикал с найлонова мрежа</i> <u>Полу-твърди вещества</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Твърди вещества</u>: 25 µl H₂O (или повече, ако е необходимо) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Восъци</u>: плосък “дископодобен” елемент с диаметър около 8 mm поставен върху тъканта и намокрен с 15 µl H₂O.	<u>Течности и вискозни вещества</u>: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm²) с използване на найлонова мрежа <i>Пред-изпитвателна съвместимост на изпитвания химикал с найлонова мрежа</i> <u>Твърди вещества</u>: 20 µl ± 2µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Восъкоподобни/лепкави</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) с използване на найлонова мрежа	<u>Течности</u>: 50 µl (83.3 µl/cm²) с използване на найлонова мрежа <i>Пред-изпитвателна съвместимост на изпитвания химикал с найлонова мрежа</i> <u>Полутвърди вещества</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Твърди вещества</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (или повече, ако е необходимо) <u>Восъкоподобни вещества</u>: плосък “бисквитообразен” елемент с диаметър около 8 mm поставен върху тъканта и намокрен с 15 µl H₂O

Компоненти на модела за изпитване	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Предварителна проверка за пряка редукция на МТТ	50 µl (течност) или 20 mg (твърдо вещество) + 2 ml МТТ 0,3 mg/ml разтвор за 180 ± 5 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът стане син/пурпурен, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени с вода	50 µl (течност) или 25 mg (твърдо вещество) + 1 ml МТТ 1 mg/ml разтвор за 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът стане син/пурпурен, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени чрез замразяване	40 µl (течност) или 20 mg (твърдо вещество) + 1 ml МТТ 1 mg/ml разтвор за 180± 15 мин при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът стане син/пурпурен, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени чрез замразяване	50 µl (течност) или 25 mg (твърдо вещество) + 1 ml МТТ 1 mg/ml разтвор за 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът стане син/пурпурен, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени чрез замразяване
Предварителна проверка за цветна интерференция	10 µl (течност) или 10 mg (твърдо вещество) + 90 µl H₂O смесени за 15 мин. при стайна температура → ако разтворът се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли	50 µl (течност) или 25 mg (твърдо вещество) + 300 µl H₂O за 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли	40 µl (течност) или 20 mg (твърдо вещество) + 300 µl H₂O смесени за 60 мин. при стайна температура → ако изпитваният химикал се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли	50 µl (течност) или 25 mg (твърдо вещество) + 300 µl H₂O за 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност → ако разтворът се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли
Експозиция време и температура	3 мин., 60 мин.(± 5 мин.) и 240 мин.(± 10 мин.) Във вентилиран шкаф Стайна температура (СТ, 18-28°C)	3 мин. при СТ и 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност	3 мин. при СТ и 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност	3 мин. при СТ и 60 мин. при 37°C, 5% CO₂, 95% относителна влажност

Компоненти на модела за изпитване	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
лакиране чрез промиване	25 ml 1x PBS (2 ml/изхвърляне)	20 пъти с постоянна слаба струя 1x PBS	20 пъти с постоянна слаба струя 1x PBS	20 пъти с постоянна слаба струя 1x PBS
Отрицателна контрола	50 µl разтвор на NaCl (9 g/l) Изпитан с всяко време за експозиция	50 µl H ₂ O Изпитан с всяко време за експозиция	40 µl H ₂ O Изпитан с всяко време за експозиция	50 µl H ₂ O Изпитан с всяко време за експозиция
Положителна контрола	50 µl Ледена оцетна киселина Изпитан само за 4 часа	50 µl 8N KOH Изпитан с всяко време за експозиция	40 µl 8N KOH Изпитан само за 1 час	50 µl 8N KOH Изпитан с всяко време за експозиция
Разтвор на МТТ	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Инкубация на МТТ време и температура	180 мин. (± 15 мин.) при 37°C, 5% CO ₂ , 95% относителна влажност	180 мин. при 37°C, 5% CO ₂ , 95% относителна влажност	180 мин. (± 15 мин.) при 37°C, 5% CO ₂ , 95% относителна влажност	180 мин. при 37°C, 5% CO ₂ , 95% относителна влажност
Екстрахиращ разтворител	500 µl киселинен изопропанол (0.04 N HCl в изопропанол) (изолирана тъкан, напълно потопена)	2 ml изопропанол (екстракция от горната и долната част на вставката)	1,5 ml изопропанол (екстракция от горната и долната част на вставката)	2 ml изопропанол (екстракция от горната и долната част на вставката)
Време и температура на екстракция	За през нощта при СТ, защитени от светлина	За през нощта без разклащане при СТ или за 120 мин. с разклащане (~120 об./мин.) при СТ	За през нощта без разклащане при СТ или за 120 мин. с разклащане (~120 об./мин.) при СТ	За през нощта без разклащане при СТ или за 120 мин. с разклащане (~120 об./мин.) при СТ

Компоненти на модела за изпитване	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Показание за оптична плътност	570 nm (545 - 595 nm) без еталонен филтър	570 nm (или 540 nm) без еталонен филтър	570 nm (540 - 600 nm) без еталонен филтър	540 - 570 nm без еталонен филтър
Контрол на качеството на тъканта	18-часово третиране с SDS $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,0 \text{ mg/ml}$	Третиране с 1% Triton X-100 $4,08 \text{ часа} \leq \text{ET}_{50} \leq 8,7 \text{ часа}$	Третиране с 1% Triton X-100 $4,0 \text{ часа} \leq \text{ET}_{50} \leq 10,0 \text{ часа}$	Третиране с 1% Triton X-100 $2,0 \text{ часа} \leq \text{ET}_{50} \leq 7,0 \text{ часа}$
Критерии за приемливост	1. Средната оптична плътност (OD) на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (NaCl), трябва да бъде $\geq 0,6$ и $\leq 1,5$ за всяко време за експозиция 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 4 часа на положителната контрола (ледена оцетна киселина), изразена като % от отрицателната контрола, трябва да бъде $\leq 20\%$ 3. В диапазона 20-100% жизнеспособност и за $\text{ODs} \geq 0,3$, разликата в жизнеспособността между две тъканни повторения не трябва да надвишава 30%.	1. Средната оптична плътност (OD) на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (H_2O), трябва да бъде $\geq 0,8$ и $\leq 2,8$ за всяко време за експозиция 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 1 час на положителната контрола (8N KOH), изразена като % от отрицателната контрола, трябва да бъде $\leq 15\%$ 3. В диапазона 20-100% жизнеспособност, Коефициентът на вариация (CV) между две тъканни повторения трябва да бъде $\leq 30\%$	1. Средната оптична плътност (OD) на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (H_2O), трябва да бъде $\geq 0,8$ и $\leq 3,0$ за всяко време за експозиция 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 1 час (и 4 часа, ако е приложимо) на положителната контрола (8N KOH), изразена като % от отрицателната контрола, трябва да бъде $< 15\%$ 3. В диапазона 20-100% жизнеспособност и за $\text{ODs} \geq 0,3$, разликата в жизнеспособността между две тъканни повторения не трябва да надвишава 30%	1. Средната оптична плътност (OD) на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (H_2O) трябва да бъде $\geq 0,8$ и $\leq 2,8$ за всяко време за експозиция 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 1 час на положителната контрола (8N KOH), изразена като % от отрицателната контрола, трябва да бъде $< 20\%$ 3. В диапазона 20-100% жизнеспособност и за $\text{ODs} \geq 0,3$, разликата в жизнеспособността между две тъканни повторения не трябва да надвишава 30%

Допълнение 3

ЕФЕКТИВНОСТ НА МОДЕЛИТЕ НА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОД-КАТЕГОРИЗАЦИЯ

Таблицата по-долу предоставя ефективностите на четирите модела на изпитване, изчислени на базата на набор от 80 химикала от четири разработчика на изпитвания. Изчисленията бяха извършени от секретариата на ОИСР, прегледани и съгласувани от експертна под-група (21) (23).

Моделите за изпитване EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ и epiCS® могат да определят под-категории (т.е. 1A спрямо 1B и 1C спрямо NC)

Ефективност, нива на надценяване и подценяване при класифициране и точност (възможност за прогнозиране) на четирите модела на изпитване, базирани на набор от 80 химикала, всички изпитани с 2 или 3 серии във всеки модел на изпитване:

СТАТИСТИКА НА ПРОГНОЗИРАНИЯТА, ПОЛУЧЕНА ЗА ЦЕЛИЯ НАБОР ОТ ХИМИКАЛИ (n= 80 химикала, изпитани в рамките на 2 независими серии за epiCS® или 3 независими серии за EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ и SkinEthic™ RHE, т.е. 159* или 240 класификации, респективно)				
<i>*една химикала бяха изпитани веднъж в epiCS® поради липса на наличности (23)</i>				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Надценяване при класификация:				
1B и 1C надценени при класификация като 1A	21,50%	29,0%	31,2%	32,8%
NC надценени при класификация като 1B и	20,7%	23,4%	27,0%	28,4%
NC надценени при класификация като 1A	0,00%	2,7%	0,0%	0,00%
надценени при класификация корозивни	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Глобален процент на надценяване при	17,9%	23,3%	24,5%	25,8 %
Подценяване при класификация:				
1A подценени при класификация като 1B и	16,7%	16,7%	16,7%	12,5%
1A подценени при класификация като NC	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B и 1C подценени при класификация като	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Глобален процент на подценяване при	3,3%	2,5%	5,4%	4,4 %
Правилни класификации:				
1A правилно класифицирани	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%

1В и /1С правилно класифицирани	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NC правилно класифицирани	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Цялостна точност	78,8%	74,2%	70%	69,8%

NC: Не-корозивен

Допълнение 4

Ключови параметри и критерии за приемане за квалифициране на BETX/UBETX спектрофотометрична система за измерване на МТТ формазан, извлечен от тъкан на RhE

Параметър	Протокол, извлечен от Ръководството на FDA (37)(38)	Критерии за приемливост
Избирателност	Анализ на изопропанол, жива празна проба (изопропанолов екстракт от живи тъкани на RhE, без каквото и да било третиране), мъртва празна проба изопропанолов екстракт от умъртвени тъкани на RhE, без каквото и да било третиране)	$\text{Площ}_{\text{интерференция}} \leq 20\% \text{ от площта}_{\text{LLOQ}}^1$
Прецизност	Качествени контроли (т.е., МТТ формазан с концентрация 1.6 µg/ml, 16 µg/ml и 160 µg/ml) в изопропанол (n=5)	$\text{CV} \leq 15\%$ или $\leq 20\%$ за LLOQ
Точност	Качествени контроли в изопропанол (n=5)	$\% \text{откл.} \leq 15\%$ или $\leq 20\%$ за LLOQ
Матричен ефекти	Качествени контроли в жива празна проба (n=5)	$85\% \leq \text{Матричен ефект} \leq 115\%$
Процент на пренасяне	Анализ на изопропанол съгласно ULOQ ² стандарта	$\text{Площ}_{\text{интерференция}} \leq 20\% \text{ от площта}_{\text{LLOQ}}$
Възпроизводимост (в рамките на деня)	3 независими калибрационни криви (базирани на 6 последователни 1/3 разреждания на МТТ формазан в изопропанол, като се започне от ULOQ, т.е., 200 µg/ml); Качествени контроли в изопропанол (n=5)	Калибрационни криви: $\% \text{откл.} \leq 15\%$ или $\leq 20\%$ за LLOQ Качествени контроли: $\% \text{откл.} \leq 15\%$ и $\text{CV} \leq 15\%$
Възпроизводимост (между различни дни)	Ден 1 1 калибрационна крива и Качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 2 1 калибрационна крива и Качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 3 1 калибрационна крива и Качествени контроли в изопропанол (n=3)	
Краткосрочна стабилност на МТТ формазан в RhE тъканен екстракт	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след 24 часа съхранение при стайна температура	$\% \text{откл.} \leq 15\%$
Дългосрочна стабилност на МТТ формазан в RhE тъканен екстракт, ако се изисква	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след няколко дни съхранение при посочена температура (напр., 4°C, -20°C, -80°C)	$\% \text{откл.} \leq 15\%$

1LLOQ: Долна граница на количествено определяне, дефинирана да обхваща 1-2% жизнеспособност на тъканта, т.е., 0,8 µg/ml.

2ULOQ: Горна граница на количествено определяне, дефинирана да бъде най-малко два пъти по-висока от най-високата очаквана концентрация на МТТ формазан в изопропанолови екстракти от отрицателни контроли т.е., 200 µg/ml."

7) В Част Б глава Б.46 се заменя със следното:

"B.46 *IN VITRO* КОЖНО ДРАЗНЕНИЕ: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМИС"

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 439 (2015). Кожното дразнене се отнася до причиняването на обратимо увреждане на кожата след прилагане на изпитван химикал за период до 4 часа [както е дефинирано от Глобалната хармонизирана система за класификация и етиктиране на химикали (GHS) на Обединените нации (ООН)] (1) и Регламент 1272/2008 на Европейския съюз (ЕС) относно класификацията, етиктирането и опаковането на вещества и смеси (CLP)¹. Този метод за изпитване предвижда *in vitro* процедура, която може да се използва за идентифициране на опасност от дразнещи химикали (вещества и смеси) в съответствие с категория 2 на GHS на ООН/CLP (2). В регионите, които не приемат опционалната категория 3 на GHS на ООН (леки дразнителни), този метод за изпитване може да се използва и за идентифициране на не-класифицирани химикали. Ето защо, в зависимост от регулаторната рамка и използваната система за класификация, този метод за изпитване може да се използва за определяне на кожната дразнимост на химикали или като самостоятелно заместващо изпитване за *in vivo* тестване за кожно дразнене, или като заместващо изпитване в рамките на стратегия за изпитване (3).
2. Оценката на кожното дразнене обикновено включва употребата на лабораторни животни [МИ Б.4, еквивалентен на ОИСП TG 404 първоначално приет през 1981 г. и ревизиран през 1992 г., 2002 г. и 2015 г.] (4). За изпитването за корозивността приети три валидирани *in vitro* методи за изпитване като ОИСП МИ Б.40 (еквивалентен на ОИСП TG 430), МИ Б.40bis (еквивалентен на ОИСП TG 431) и МИ В.65 (еквивалентен на ОИСП TG 435) (5) (6) (7). Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи към изпитването и оценката (IATA) на корозивното и дразнещо действие върху кожата описва няколко модула, които обединяват източници на информация и инструменти за анализ, и предоставя насоки за i) как да се интегрират и използват съществуващите данни за изпитвания и различни от тези

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етиктирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

за изпитвания за оценката на потенциала на химикалите за дразнене на кожата и за корозивно действие върху кожата, и ii) предлага подход, когато е необходимо по-нататъшно изпитване (3).

3. Този метод за изпитване разглежда въздействието (крайна точка) върху човешкото здраве на кожното дразнене. Той се базира на системата за *in vitro* изпитване на реконструиран човешки *епидермис* (RhE), който е почти идентичен с биохимичните и физиологичните свойства на горните части на човешката кожа, *т.е. епидермиса*. Системата за изпитване с използване на RhE използва извлечени от човек нетрансформирани кератиноцити като източник на клетки за реконструиране на епидермалния модел с представителната хистология и цитоархитектура. Стандартите за ефективност (СЕ) са налични за улесняване на валидирането и оценката на подобни и модифицирани методи за изпитване, базирани на RhE, в съответствие с принципите на Ръководството на ОИСП № 34 (8) (9). Съответстващите насоки за изпитване бяха първоначално приети през 2010 г., актуализирани през 2013 г., за да включват допълнителни модели на RhE, и актуализирани през 2015 г., за да се включи позоваване на Ръководството за IATA и да се въведе употребата на алтернативна процедура за измерване на жизнеспособността.
4. За четирите налични в търговската мрежа модела за изпитване *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) бяха проведени изследвания за предварително валидиране, оптимизация и валидиране, основани на системата за изпитване с използване на RhE (с чувствителност 80%, специфичност 70% и точност 75%). Тези четири модела за изпитване са включени в настоящото ръководство за изпитване и са посочени в допълнение 2, което освен това предоставя информация за вида на изследването за валидиране, използвано за валидиране на съответните методи за изпитване. Както бе отбелязано в допълнение 2, за разработката на настоящия метод за изпитване е използван Валидирания референтен метод (VRM) и Стандартите за ефективност (8).
5. Взаимното приемане на данните от ОИСП се гарантира само за моделите за изпитване, валидирани съгласно Стандартите за ефективност (8), ако тези модели са прегледани и приети от ОИСП. Всички модели за изпитване, включени в настоящия метод за изпитване и съответните насоки за изпитване (TG) на ОИСП, могат да се използват, за да се покрият изискванията на държавите за резултати от изпитвания от *in vitro* методи за изпитване на кожно дразнене, като същевременно се възползват от предимствата на Взаимното приемане на данни.
6. Определенията на термините, използвани в настоящия документ, са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

7. Едно ограничение на метода за изпитване, както бе демонстрирано от пълното прогнозно изследване за валидиране, оценяващо и характеризиращо методите за изпитване с използване на RhE (16) е, че не позволява класификацията на химикали съгласно опционалната категория 3 (леки дразнителни) на GHS на ООН (1). Така, регулаторната рамка в страните членки ще решава как ще се използва този метод за изпитване. За ЕС, категория 3 не е възприета в CLP. За пълна оценка на локалните кожни въздействия след еднократна дермална експозиция следва да се направи справка с Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи за изпитване и оценка (3). Признава се, че използването на човешка кожа е предмет на национални и международни етични съображения и условия.
8. Този метод за изпитване разглежда въздействието (крайна точка) върху човешкото здраве на кожното дразнене. Тъй като този метод за изпитване не осигурява адекватна информация за корозивното действие върху кожата, следва да се отбележи, че МИ Б.40bis (еквивалентен на ОИСП TG 431) относно корозивното действие върху кожата се базира на същата система за изпитване с използване на RhE, макар и използваща друг протокол (6). Този метод за изпитване е базиран на моделите на RhE, използващи човешки кератиноцити, които следователно представляват *in vitro* прицелния орган на биологичния вид, представляващ интерес. Освен това той пряко обхваща първоначалната стъпка от възпалителната каскада/механизма на действие (клетъчно и тъканно увреждане, водещо до локализирана травма), възникващи по време на дразнене *in vivo*. В рамките на валидирането, стоящо зад настоящия метод за изпитване, бе изпитан широк обхват от химикали, като базата данни на изследването за валидиране включва общо 58 химикала (16) (18) (23). Методът за изпитване е приложим за твърди вещества, течности, полутвърди вещества и восъци. Течностите могат да бъдат или да не бъдат водни разтвори; твърдите вещества може да са разтворими или неразтворими във вода. Когато е възможно, твърдите вещества следва да бъдат смилани до фин прах преди прилагане; не се изисква друга предварителна обработка на пробата. Газовете и аерозолите все още не са оценени с изследване за валидиране (29). Макар да се предполага, че те могат да бъдат изпитвани, като се използва технологията с използване на RhE, настоящият метод не дава възможност за изпитване на газове и аерозоли.
9. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Въпреки това обаче, поради факта, че смесите покриват широк спектър категории и състави и, че понастоящем има налична само ограничена информация по отношение на изпитването на смеси, в случаите, когато с доказателство може да се

демонстрира неприложимостта на метода за изпитване към специфична категория смеси (напр. съгласно стратегия, предложена от Eskes *et al.* 2012) (30)), методът на изпитване не следва да се използва за тази специфична категория смеси. Също толкова внимателно трябва да се подхожда в случай, че се открие, че специфични химични класове или физикохимични свойства са неприложими към настоящия метод за изпитване.

10. Изпитваните химикали, поглъщащи светлината в същия диапазон като МТТ формаза и изпитваните химикали, които могат пряко да редуцират виталния оцветител МТТ (до МТТ формаза) могат да попречат на измерванията на клетъчната жизнеспособност и изискват употребата на адаптирани контроли за корекции (вж. точки 28-34).
11. Едно изпитване, включващо три тъканни повторения, би следвало да е достатъчно за изпитването на даден химикал, когато класификацията е недвусмислена. При все това, при наличие на гранични резултати, напр. несъответстващи измервания на повторения и/или средна жизнеспособност, изразена процентно като $50 \pm 5 \%$, следва да се разгледа възможността за втора серия, както и за трета серия в случай на наличие на несъответстващи резултати между първите две серии.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

12. Изпитваният химикал се прилага локално върху триизмерен модел от RhE, състоящ се от нетрансформирани епидермални кератиноцити, извлечени от човек, които са били култивирани, за да образуват многослоен, високодиференциран модел на човешкия *епидермис*. Той се състои от организирани базален, шипчест и зърнест слой, както и от многослоен *stratum corneum*, съдържащ междуклетъчни ламелни липидни слоеве, представляващи основните липидни класове, аналогични на онези, които се наблюдават *in vivo*.
13. Кожно дразнене, предизвикано от химикал, проявяващо се главно чрез еритема и оток, възниква в резултат от каскада от събития, започващи с проникването на химикалите през *stratum corneum*, където те могат да увредят подлежащите слоеве от кератиноцити и други кожни клетки. Увредените клетки може или да освобождават възпалителни медиатори или да индуцират възпалителна каскада, която действа и върху клетките на *дермата*, особено стромалните и ендотелиалните клетки на кръвоносните съдове. Именно на разширението и повишената пропускливост на ендотелиалните клетки се дължи наблюдавания еритем и оток (29). По-специално, методите за изпитване базирани на RhE, при отсъствието на каквато и да било васкуларизация в системата за *in vitro* изпитване, измерват първоначалните събития от каскадата, напр. клетъчно / тъканно увреждане (16) (17), като използват клетъчната жизнеспособност като показател.

14. Клетъчната жизнеспособност в RhE моделите се измерва чрез ензимно превръщане на виталния оцветител МТТ [3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенилтетразолиев бромид, Тиазолил синьо; CAS номер 298-93-1], в синя формаза нова сол, която се измерва количествено след екстракция от тъканите (31). Дразнещите химикали се определят по способността им да намаляват клетъчната жизнеспособност под определени прагови нива (*m.e.* ≤ 50%, за категория 2 на GHS на ООН/CLP). В зависимост от регулаторната рамка и приложимостта на метода за изпитване, изпитваните химикали, които причиняват клетъчна жизнеспособност над определеното прагово ниво, може да се разглеждат като не-дразнещи (*m.e.* > 50%, Без категория).

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

15. Преди рутинното използване на който и да било от четирите валидирани модели за изпитване, които се придържат към настоящия метод за изпитване (допълнение 2), лабораториите следва да докажат техническа компетентност, като използват десетте вещества за изпитване за пригодност, посочени в таблица 1. При ситуации, в които например, дадено вписано вещество е неналично, може да се използва друго вещество, за което има налични адекватни *in vivo* и *in vitro* справочни данни (напр. от списъка на референтните химикали (8)), при условие че се прилагат същите критерии за избор, които са описани в таблица 1. Използването на алтернативно опитно вещество следва да бъде обосновано.

16. Като част от процедурата за изпитване на компетентността е препоръчително потребителите да проверят бариерните свойства на тъканите след получаване, както е посочено от производителя на RhE модела. Това е особено важно, ако тъканите са били превозвани на дълго разстояние или в продължение на дълги периоди от време. След като даден метод за изпитване е бил успешно създаден и компетентността при употребата му - установена и доказана, обикновено, такава проверка не би била необходима. Все пак, при редовното използване на даден метод за изпитване, е препоръчително да се продължи с оценяването на бариерните свойства на редовни интервали.

Таблица 1: Опитни вещества¹

Вещество	CAS №	<i>In vivo</i> оценка ²	Агрегатно състояние	Категория в GHS на ООН
НЕКЛАСИФИЦИРАНИ ВЕЩЕСТВА (Без категория по GHS на ООН)				
Нафтилоцетна киселина	86-87-3	0	Твърд	Без категория
Изопропанол	67-63-0	0,3	Течност	Без категория
Метилов стеарат	112-61-8	1	Твърд	Без категория
Хептил бутират	5870-93-9	1,7	Течност	Без категория (Опционална кат. 3) ³

Хексил салицилат	6259-76-3	2	Течност	Без категория (Опционална кат. 3) ³
КЛАСИФИЦИРАНИ ВЕЩЕСТВА (категория 2 по GHS на ООН)				
Цикламен алдехид	103-95-7	2,3	Течност	Кат. 2
1-бромхексан	111-25-1	2,7	Течност	Кат. 2
Калиев хидроксид (5% воден разтвор)	1310-58-3	3	Течност	Кат. 2
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	3,3	Твърд	Кат. 2
хептанал	111-71-7	3,4	Течност	Кат. 2

1 Опитните вещества са подмножество от вещества, използвани в изследване за валидиране и подборът им се базира на следните критерии; i) химическите вещества да бъдат налични в търговската мрежа; ii) да бъдат представителни за пълната скала на Draize за силата на дразнене (от непредизвикващо дразне вещество до вещество, предизвикващо силно дразнене); iii) да имат ясно определена химична структура; iv) да са представителни за химичната функционалност, използвана в процеса на валидиране; v) да предоставят възпроизводими резултати *in vitro* в множество изпитвания и множество лаборатории; vi) да са точно прогнозирани *in vitro*, и vii) да не са свързани с изключително токсичен профил (напр. канцерогенни или токсични за репродуктивната система) и да не са свързани с прекомерно високи разходи за обезвреждане.

2 *In vivo* оценка в съответствие с МИ Б.4 (4).

3 Съгласно настоящия метод за изпитване, опционалната категория 3 (леки дразнители) на GHS на ООН (1) се разглежда като Без категория.

ПРОЦЕДУРА

17. Следва описание на компонентите и процедурите на метода за изпитване с използване на RhE за оценка на кожното дразнене (Вижте и допълнение 3 за параметрите, свързани с всеки модел за изпитване). Налични са стандартни оперативни процедури (SOP) за четирите модела, съгласно настоящия метод за изпитване (32) (33) (34) (35).

КОМПОНЕНТИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА RHE

Общи условия

18. За реконструирането на епитела следва да се използват нетрансформирани човешки кератиноцити. Под функционалния *stratum corneum* трябва да има множество слоеве от жизнеспособни епителни клетки (базален слой, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). Роговият слой *stratum corneum* следва да бъде многослоен и да съдържа основния липиден профил, за да създаде функционална бариера, която да е устойчива на бързо проникване на цитотоксични химикали за сравнение, напр. натриев додецил сулфат (SDS) или Triton X-100. Бариерната функция следва да бъде доказана и може да бъде оценена или чрез определяне на концентрацията, при която химикал за сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50% (IC₅₀) след

определено време на експозиция, или чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50% (ET₅₀) при прилагане на химикал за сравнение с определена фиксирана концентрация. Задържащите свойства на модела с използване на RhE следва да предотвратяват заобикалянето на *stratum corneum* и преминаването на материал към жизнеспособната тъкан, което би довело до неадекватно моделиране на експозицията на кожата. Моделът на RhE следва да не е заразен с бактерии, вируси, микоплазма или гъбички.

Функционални условия

Жизнеспособност

19. Използваното изпитване за количествено определяне на жизнеспособността е изпитването с МТТ (31). Жизнеспособните клетки на тъканния модел от RhE могат да редуцират виталния оцветител МТТ в син формазагов преципитат на МТТ, който след това се извлича от тъканта с помощта на изопропанол (или подобен разтворител). Оптичната плътност (OD) само на разтворителя, използван за екстракцията, следва да бъде достатъчно ниска, т.е. OD < 0,1. Извлеченият МТТ формаза може да се определи количествено с помощта или на стандартно измерване на коефициента на поглъщане (OD), или чрез спектрофотометрична процедура с BETX/UBETX (36). Ползвателите на модела с използване на RhE следва да гарантират, че всяка използвана партида от модела с използване на RhE отговаря на определените критерии за отрицателната контрола. Разработчикът/доставчикът на модела с използване на RhE определя допустимия размах (горна и долна граница) за стойностите на OD на отрицателната контрола (при условията на метода за изпитване на кожно дразнене). Допустим размах на четирите валидирани модела на изпитване с използване на RhE, включени в настоящия метод за изпитване, са дадени в таблица 2. Ползвателят на спектрофотометрия с BETX/UBETX следва да използва интервалите за OD на отрицателните контроли, посочени в таблица 2, като критерий за приемливост за отрицателната контрола. Следва да се документира, че тъканите, третирани с отрицателната контрола, са стабилни като култура (дават сходни измервания за жизнеспособност) за периода на продължителност на експозицията.

Таблица 2: Допустим размах на стойностите на OD на отрицателната контрола на моделите за изпитване, включени в настоящия МИ

	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Барьерна функция

20. Роговият слой *stratum corneum* и липидният му състав следва да бъдат достатъчни, за да устоят на бързото проникване на цитотоксични химикали за сравнение *напр.* SDS или Triton X-100, оценено с IC_{50} или ET_{50} (таблица 3).

Морфология

21. Следва да се представи хистологично изследване на модела с използване на RhE, доказващо структура, подобна на човешки *епидермис* (включваща многослоен *stratum corneum*).

Възпроизводимост

22. Резултатите от положителните и отрицателните контроли на метода за изпитване следва да докажат възпроизводимост във времето.

Контрол на качеството (КК)

23. Моделът на RhE следва да бъде използван, само ако разработчикът/доставчикът докаже, че всяка използвана партида от RhE модела отговаря на определените критерии за пускане в обращение на продукцията, сред които най-значими са тези за *жизнеспособността* (точка 19), *барьерната функция* (точка 20) и *морфологията* (точка 21). Тези данни следва да се предоставят на ползвателите на метода за изпитване, така че те да могат да включат тази информация в протокола от изпитването. Разработчикът/доставчикът на модела на RhE следва да определи интервал на приемливост (горна и долна граница) за стойностите на IC_{50} или ET_{50} . За надеждно прогнозиране на класификацията на дразненето могат да се приемат само резултати, получени с отговарящи на изискванията тъкани. Интервалите на приемливост за четирите модели на изпитване, включени в настоящите TG, са дадени в таблица 3.

Таблица 3: Критерии за КК за пускане в обращение на партида, включени в настоящия МИ

	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiSkin™ (SM) 18-часово третиране с SDS) (32)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (33)	$ET_{50} = 4,0 \text{ часа}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ часа}$
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34)	$ET_{50} = 4,0 \text{ часа}$	$ET_{50} = 10,0 \text{ часа}$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT 18-часово третиране с SDS) (35)	$IC_{50} = 1,4 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 4,0 \text{ mg/ml}$

Прилагане на изпитвания химикал и химикалите за контроли

24. За всеки изпитван химикал и за контролите във всяко изпитване следва да се използват най-малко три репликата. За течни, както и за твърди химикали, следва да се прилага достатъчно количество от изпитвания химикал за равномерно покриване на цялата повърхност на *епидермиса*, като същевременно се избягва прилагане на изобилна доза, *т.е.* в диапазона от 26 до 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ или mg/cm^2 (вж. допълнение 3). Преди прилагане на твърди химикали, повърхността на *епидермиса* следва да се навлажни с дейонизирана или дестилирана вода, за да се подобри контактът между изпитвания химикал и повърхността на *епидермиса*. Когато е възможно, твърдите вещества следва да се изпитват под формата на фин прах. В някои случаи може да се използва найлонова мрежа като помощно средство при разстилане (вж. допълнение 3). В края на периода за експозиция изпитваният химикал следва внимателно да бъде отмит от повърхността на *епидермиса* с буферен воден разтвор или 0,9% NaCl. В зависимост от използваните модели за изпитване с използване на RhE, периодът на експозиция варира между 15 и 60 минути, а температурата на инкубиране между 20 и 37°C. Тези периоди на експозиция и температури са оптимизирани за всеки отделен метод за изпитване с използване на RhE и представляват различните присъщи свойства на моделите за изпитване (*напр.* бариерната функция) (вж. Допълнение 3).
25. Във всяка серия следва да се използват паралелна отрицателна контрола (ОК) и положителна контрола (ПК), за да се докаже, че жизнеспособността (с използване на ОК), бариерната функция и получената чувствителност (с използване на ПК) на тъканите са в рамките на определен обхват на приемане от предходни периоди. За положителна контрола е предложен 5 % воден разтвор на SDS. Предложеният ОК е или вода, или фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS).

Измервания на клетъчната жизнеспособност

26. Съгласно процедурата за изпитване, от съществено значение е измерването на жизнеспособността да не се извършва непосредствено след експозиция на изпитвания химикал, а след достатъчно дълъг период след третиране за инкубиране на промитата тъкан в прясна среда. Този период позволява както възстановяването от леките цитотоксични ефекти, така и появата на ясно изразени цитотоксични ефекти. Беше открито, че 42-часов период за инкубиране след третирането е оптимален, по време на оптимизацията на изпитването на два от моделите за изпитване базирани на RhE, стоящи зад настоящия метод за изпитване (11) (12) (13) (14) (15).
27. Изпитването с МТТ е стандартизиран метод за количествено определяне, който следва да се използва за измерване на клетъчната жизнеспособност, съгласно настоящия метод за изпитване. Той е съвместим с използване в триизмерни тъканни модели. Тъканната проба се поставя в разтвор на МТТ с подходяща концентрация

(напр. 0,3 - 1 mg/ml) за 3 часа. МТТ се преобразува в син формаза от жизнеспособните клетки. След това от тъканта се извлича получения преципитиран син формаза с помощта на разтворител (напр. изопропанол, киселинен изопропанол), като концентрацията на формаза се измерва като се определи OD при 570 nm с помощта на филтър с максимален обхват на пропускане ± 30 nm или с BETX/UBETX спектрофотометрична процедура (вж. точка 34) (36).

28. Оптичните свойства на изпитвания химикал или неговото химично въздействие върху МТТ (напр. химикалите могат както да причинят, така и да предотвратят или обърнат посоката на оцветяване) може да попречи на изследването, което да доведе до невярна оценка на жизнеспособността. Това може да се случи, когато специфичен изпитван химикал не бъде напълно отстранен от тъканта чрез промиване или когато проникне в *епидермиса*. Ако изпитван химикал действа директно върху МТТ (напр. редуктор на МТТ), има естествено оцветяване или бъде оцветен по време на третирането на тъканта, следва да се използват допълнителни контроли за откриване и коригиране на интерференциите на изпитвания химикал по отношение на техниката за измерване на жизнеспособността (вж. точки 29 и 33). Подробно описание на това как се коригира пряката редукция на МТТ и интерференциите от оцветителите е налично с SOP за четирите модела на изпитване, включени в настоящия метод за изпитване (32)(33)(34)(35).
29. За да се идентифицират преките редуктори на МТТ, всеки изпитван химикал следва да бъде добавен към пряко приготвен разтвор на МТТ. Ако сместа с МТТ, съдържаща изпитвания химикал стане синя/пурпурна, се приема, че изпитваният химикал пряко редуцира МТТ, като следва да се извърши допълнителна функционална проверка на нежизнеспособни RhE тъкани, независимо от използването на стандартното измерване на коефициента на поглъщане (OD) или BETX/UBETX спектрофотометрична процедура. При тази допълнителна функционална проверка се използват умъртвени тъкани, които имат единствено остатъчна метаболитна активност, но поглъщат изпитвания химикал по начин, сходен с този на жизнеспособните тъкани. Всеки изпитван химикал, редуциращ МТТ, се прилага върху поне две умъртвени тъканни повторения, които биват подложени на цялата процедура за изпитване, за да предизвикат неспецифична МТТ редукция (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Един NSMTT контрол е достатъчен за всеки изпитван химикал, независимо от броя на изпълнените независими изпитвания/серии. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта, като от процента на жизнеспособността на тъканта, получен за живи тъкани, изложени на въздействието на редуктор на МТТ, се извади процентът неспецифична редукция на МТТ, получен за умъртвени тъкани, изложени на същия редуктор на МТТ, изчислен във връзка със серията с отрицателна контрола, изпълнено паралелно с изпитването, което се коригира (%NSMTT).

30. За да се установи евентуалната интерференция чрез оцветени изпитвани химикали или изпитвани химикали, които са се оцветили при контакт с вода или изопропанол, и за да се вземе решение относно необходимостта от допълнителни контроли, трябва да се извърши спектрален анализ на изпитвания химикал във вода (средата по време на експозиция) и/или изопропанол (разтворът за извличане). Ако изпитваният химикал във вода и/или изопропанол поглъща светлина в диапазона от 570 ± 30 nm, следва да бъдат извършени допълнителни контроли за оцветителя или като алтернатива следва да бъде изпълнена BETX/UBETX спектрофотометрична процедура, в който случай тези контроли не са необходими (вж. точки 33 и 34). Когато се извършва измерване на стандартния коефициент на поглъщане (OD), всеки оцветен изпитван химикал, причиняващ интерференция се прилага върху най-малко две повторения от жизнеспособни тъкани, които биват подложени на процедурата за изпитване, но по време на етапа за инкубация с МТТ се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ, за да предизвикат неспецифичен цвят (NSC_{living}) контрол. NSC_{living} контролът трябва да се изпълни паралелно с изпитването на оцветения изпитван химикал, а в случай на множество изпитвания, трябва да се проведе независим NSC_{living} контрол за всяко изпълнено изпитване (във всяка серия), поради присъщата биологична изменчивост на живите тъкани. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта като от процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция и инкубирани с разтвор на МТТ се извади процента неспецифичен цвят, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция и инкубирани със среда без МТТ, изпълнена паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{living}).
31. Изпитваните химикали, които се определят като причиняващи пряка редукция на МТТ (вж. точка 29) и цветна интерференция (вж. точка 30) също изискват трети набор от контроли, освен NSMTT и NSC_{living} контроли, описани в предходните точки, когато се изпълнява стандартното измерване на коефициента на поглъщане (OD).. Обикновено такъв е случаят с тъмно оцветените изпитвани химикали, създаващи интерференция на изследването на МТТ (напр., син, пурпурен, черен), защото техният присъщ цвят пречи на оценката на тяхната способност пряко да редуцират МТТ, както е описано в точка 29. Тези изпитвани химикали могат да се свързват както с живи, така и с умъртвени тъкани и поради това, NSMTT контролът може не само да коригира потенциала за пряка редукция на МТТ на изпитвания химикал, но и цветната интерференция, произтичаща от свързването на изпитвания химикал с умъртвените тъкани. Това би могло да доведе до двойна корекция за цветна интерференция, тъй като контролът NSC_{living} вече коригира цветната интерференция, произтичаща от свързването на изпитвания химикал с живите тъкани. За да се избегне възможна двойна корекция за цветна интерференция трябва да се изпълни трети контрол за неспецифичен цвят в умъртвени тъкани (NSC_{killed}). При този

допълнителен контрол, изпитваният химикал се прилага върху най-малко две умъртвени тъканни повторения, които биват подложени на цялата процедура за изпитване, но по време на етапа за инкубация с МТТ, се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ. Единичен NSC_{killed} контрол е достатъчен за всеки изпитван химикал, независимо от броя на изпълнените независими изпитвания/изпитвани серии, но трябва да се изпълнява паралелно с NSMTT контрола и, когато е възможно, с една и съща партида тъкани. След това се изчислява реалната жизнеспособност на тъканта като от процента на жизнеспособност на тъканта, получен за живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, се извадят %NSMTT и %NSC_{living} и се прибави процентът неспецифичен цвят, получен от умъртвени тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, инкубирани със среда без МТТ, изчислен във връзка със серията с отрицателна контрола, изпълнена паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{killed}).

32. Важно е да се отбележи, че неспецифичната редукция на МТТ и неспецифичната цветна интерференция може да повишат отчетените стойности на тъканния екстракт над обхвата на линейност на спектрофотометъра. Въз основа на това, всяка лаборатория следва да определи обхвата на линейност на своя спектрофотометър с помощта на МТТ формазан (CAS # 57360-69-7), придобит от търговската мрежа, преди започване на изпитвания на изпитвани химикали за регулаторни цели. Измерването на стандартния коефициент на поглъщане (OD) с помощта на спектрофотометър е подходящо за оценяване на преките редуктори на МТТ и изпитваните химикали, причиняващи цветна интерференция, когато оптичните плътности (OD) на тъканните екстракти, получени с изпитваните химикали без каквато и да било корекция за пряка редукция на МТТ и/или цветна интерференция са в рамките на обхвата на линейност на спектрофотометъра или, когато некоригираният процент на жизнеспособност, получен с изпитвания химикал е вече $\leq 50\%$. Независимо от това, резултатите за изпитваните химикали, предизвикващи %NSMTT и/или %NSC_{living} $\geq 50\%$ от отрицателната контрола следва да се приемат предпазливо, тъй като това е гранична стойност, използвана за разграничаване на класифицирани от неклассифицирани химикали (вж. точка 36).
33. По отношение на оцветените изпитвани химикали, които не са съвместими с измерването на стандартния коефициент на поглъщане (OD), поради твърде силна интерференция в изследването на МТТ, може да се приложи алтернативната BETX/UBETX спектрофотометрична процедура за измерване на МТТ формазана (вж. точка 34) (36). BETX/UBETX системата за спектрофотометрия позволява отделянето на МТТ формазана от изпитвания химикал преди количественото определяне (36). По тази причина, никога не се изискват NSC_{living} или NSC_{killed} контроли, когато се използва BETX/UBETX спектрофотометрия, независимо от химикала, който е подложен на изпитване. Независимо от това, ако има подозрения,

че изпитваният химикал пряко редуцира МТТ или е с цвят, който пречи на оценката на способността за пряко редуциране на МТТ (както е описано в точка 29), следва да се използват контролите NSMTT. Когато се използва BETX/UBETX спектрофотометрия за измерване на МТТ формазан, процентът на жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на пиковата площ на МТТ формазан, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал спрямо пика на МТТ формазан, получен при паралелната отрицателна контрола. По отношение на изпитваните химикали, които могат пряко да редуцират МТТ, реалната жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал, минус %NSMTT. И накрая следва да се отбележи, че преките редуктори на МТТ, които може да причиняват и цветна интерференция и, които се задържат в тъканите след третиране и толкова силно редуцират МТТ, че стават причина за невъзможност за оценяване на OD (при използване на стандартно измерване на OD) или на пикови площи (при използване на BETX/UBETX спектрофотометрия) на изпитваните екстракти от тъкани, които попадат извън обхвата на линейност на спектрофотометъра, въпреки че се очаква подобни случаи да възникват само в изключително редки ситуации.

34. BETX/UBETX спектрофотометрията може да се използва и с всички видове изпитвани химикали (оцветени, неочветени, редуктори на МТТ и не-редуктори на МТТ) за измерване на МТТ формазан (36). Поради разнообразието на системите за BETX/UBETX спектрофотометрия, годността на системата за BETX/UBETX спектрофотометрия следва да бъде доказана преди употребата ѝ за количествено определяне на МТТ формазан от тъканни екстракти, като се посочи изпълнението на критериите за приемане по отношение на набор от стандартни параметри, на базата на описаните в насоките на Администрацията по храни и лекарства на САЩ за индустрията по отношение на валидирането на био-аналитични методи (36)(37). Тези ключови параметри и критериите за приемането им са показани в допълнение 4. След като критериите за приемане, дефинирани в допълнение 4 са изпълнени, системата за BETX/UBETX спектрофотометрия се разглежда като годна и готова за измерване на МТТ формазан при експерименталните условия, описани в настоящия метод за изпитване.

Критерии за приемливост

35. За всеки метод за изпитване, използващ валидни партии на модела с използване на RhE (вж. точка 23), тъканите третирани с отрицателната контрола следва да показват OD, отразяваща качеството на тъканите след стъпките на изпращане, получаване и всички обработки по протокола. Стойностите на оптичната плътност на контролите не трябва да са по-ниски от установените граници от предишни изпитвания. По подобен начин, тъканите, третирани с положителната контрола, *т.е.* с 5% воден

разтвор на SDS, следва да отразяват тяхната способност за отклик на дразнещия химикал при условията на метода на изпитване (вж. допълнение 3, а за допълнителна информация - стандартните оперативни процедури (SOP) на четирите модела на изпитване, включени в настоящите TG (32) (33) (34) (35)). Свързаните и подходящи измервания на изменчивостта между тъканните повторения, т.е. стандартните отклонения (SD) следва да попадат в рамките на допустимите граници, установени за използвания модел на изпитване (вж. допълнение 3).

Интерпретация на резултатите и модел за прогнозиране

36. Стойностите за OD, получени с всеки изпитван химикал, могат да се използват за изчисляване на процента на жизнеспособност, нормализиран спрямо отрицателната контрола, който е определен на 100%. В случай, че се използва ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия, процентът на жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на пиковата площ на МТТ формазан, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал спрямо пика на МТТ формазан, получен при паралелната отрицателна контрола. Граничната стойност на дела на клетъчна жизнеспособност, определен в проценти, разграничаваща дразнещите от неклаифицираните химикали и използваната (използваните) статистическа(-ите) процедура(и) за оценяване на резултатите и идентифициране на химикалите, следва да бъдат ясно определени, документирани и тяхната уместност доказана (за информация, вижте SOP на моделите на изпитване). Граничните стойности за прогнозиране на дразненето са дадени по-долу:

- Изпитваният химикал се идентифицира като такъв, изискващ класифициране и етикетиране, съгласно GHS на ООН/CLP (категория 2 или категория 1), ако средната тъканна жизнеспособност, изразена в проценти след експозиция и инкубация след третирането е по-ниска от или равна ($\leq$) на 50%. Тъй като моделите за изпитване с използване на RhE, обхванати от настоящия метод за изпитване, не могат да разграничат категория 1 и 2 по GHS на ООН/CLP, ще е нужна допълнителна информация за корозивното действие върху кожата, за да се определи окончателната му класификация [вижте и Ръководството на ОИСП относно IATA (3)]. В случай, че се установи, че изпитваният химикал е некорозивен (напр. на базата на МИ.40, Б.40bis или Б.65), и покаже тъканна жизнеспособност след експозиция и инкубация след третиране по-ниска от или равна ($\leq$) на 50%, изпитваният химикал се разглежда като дразнещ за кожата в съответствие с категория 2 на GHS на ООН/CLP.
- В зависимост от регулаторната рамка в страните членки, изпитваният химикал може да се счита за недразнещ за кожата в съответствие с класификацията Без категория на GHS на ООН/CLP, ако тъканната жизнеспособност след експозиция и инкубация след третиране е по-висока от ($>$) 50%.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

37. За всяка изпитвана серия следва да се протоколират в таблица данните от отделните тъканни повторения (*напр.* стойностите за OD и данни за изчисления процент на клетъчна жизнеспособност за всеки изпитван химикал, включително класификацията), включително данните от повторените експерименти, според необходимостта. В допълнение следва да се докладват средните стойности $\pm$ стандартното отклонение за всяко изпитване. Наблюдаваните взаимодействия с реагента МТТ и оцветените изпитвани химикали следва да се докладват за всеки изпитван химикал.

Протокол от изпитването

38. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал и контролни химикали:

- Вещество с една съставка: химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.;
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес: характеризирано, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките;
- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- източник, номер на партидата, при наличност;
- Обработка на изпитвания химикал/химикалите за контроли преди изпитването, ако се прилага (*напр.* затопляне, смилане);
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна;
- Условия за съхранение.

Използван модел на RhE и протокол (и обосновка за избора, ако е приложимо)

Условия на изпитване:

- Използван модел на RhE (включително партидният номер);
- Информация за калибриране на измервателното устройство (*напр.* спектрофотометър), използван филтър за дължина на вълната и лента на пропускане (ако е приложимо) за количествено определяне на МТТ формазан, и обхват на

линейност на измервателното устройство; Описание на метода, използван за количествено определяне на МТТ формазан;

- Описание на квалификационните изисквания към системата за спектрофотометрия с ВЕТХ/УВЕТХ, ако е приложимо; пълна придружаваща информация за конкретния използван модел на RhE, включително качествените му показатели; това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) Жизнеспособност;
 - ii) Барьерна функция;
 - iii) Морфология;
 - iv) Възпроизводимост и способност за прогнозиране;
 - v) Контроли на качеството (КК) на модела;
- препратка към данни за модела от предишни изпитвания; Това следва да включва, но не се ограничава до приемливост на данните за КК по отношение на предходно установените партидни данни.
- Доказване на компетентност на изпълнение на метода за изпитване преди редовна употреба чрез изпитване на опитните вещества.

Процедура на изпитване:

- Подробни данни за използваната процедура на изпитване (включително използвани процедури за измиване след периода на експозиция); Доза на използвания изпитван химикал и контроли;
- Продължителност и температура на експозиция и период на инкубация след третиране;
- Указание за използваните контроли за преки редуктори на МТТ и/или оцветяващи изпитвани химикали, ако е приложимо;
- Брой на използваните тъканни повторения за всеки изпитван химикал и контроли (ПК, отрицателна контрола и NSMTT, NSC_{living} и NSC_{killed}, ако е приложимо);
- Описание на приложените критерии за вземане на решение/модел за прогнозиране на базата на използвания модел на RhE;
- Описание на всякакви изменения в процедурата за изпитване (включително процедурите за измиване).

Критерии за приемане на серия и изпитване:

- Средни стойности и допустим размах на положителна и отрицателна контрола на базата на данни от предходни периоди; Допустимо вариране между тъканните повторения за положителни и отрицателни контроли;

- Допустимо вариране между тъканните повторения за изпитвания химикал.

Резултати:

- Представяне в табличен вид на данните за отделния изпитван химикал, за всяка серия и всяко измерване на повторение, включително OD или площ на пика на MTT формаза, процент на тъканна жизнеспособност, среден процент на тъканна жизнеспособност и стандартно отклонение (SD);
- ако е приложимо, резултатите от използваните контроли за преки редуктори на MTT и/или оцветяващи изпитвани химикали, включително OD или на пика на MTT формаза, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, стандартно отклонение (SD) и окончателен коректен процент на жизнеспособност на тъканта;
- Резултатите, получени с изпитвания(-ите) химикал(и) и контроли във връзка с определените критерии за приемане на серията и изпитването;
- Описание на други наблюдавани ефекти;
- Получената класификация по отношение на използвания модел за прогнозиране/критериите за вземане на решение.

Обсъждане на резултатите

Заклучения

ЛИТЕРАТУРА

- (4) Глава Б.4 от настоящото приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху кожата.
- (5) Глава Б.40 настоящото приложение, *In Vitro* корозивно действие върху кожата: Транскутанно електрическо съпротивление (TER).
- (6) Глава Б.40bis от настоящото приложение, *In Vitro* корозивно действие върху кожата: Метод за изпитване с използване на реконструиран човешки епидермис (RhE).
- (7) Глава Б.65 от настоящото Приложение, *In Vitro* Метод за изпитване с мембранна бариера.

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи делът на верните резултати при даден метод за изпитване (9).

Клетъчна жизнеспособност: Параметър, измерващ общата активност на клетъчна популация *напр.* като способността на клетъчните митохондриални дехидрогенази да редуцират виталния оцветител МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазолил син), който, в зависимост от измерената крайна точка и използваната изпитвателна постановка, е свързан с общия брой и/или жизнеспособност на живите клетки.

Химикал: означава вещество или смес.

Съответствие: Това е мярка за ефективността на моделите за изпитване, които дават категоричен резултат и е един аспект на приложимостта му. Терминът понякога се използва взаимозаменяемо с термина „точност“ и се определя като делът на всички изпитани химикали, които са правилно класифицирани като положителни или отрицателни. Съответствието зависи в голяма степен от преобладаването на положителните контроли сред типовете на текущо изпитвания химикал (9).

ЕТ₅₀: Може да се оцени чрез определяне на необходимото време за експозиция за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50% при прилагане на химикала за сравнение с определена фиксирана концентрация, вж. и IC₅₀.

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали на Организацията на обединените нации (ООН)): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

ВЕТХ: Високоэффективна течна хроматография.

ІАТА: Интегриран подход за изпитване и оценка

IC₅₀: Може да се оцени чрез определяне на концентрацията, при която химикалът засяга сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50% (IC₅₀) след фиксирано време на експозиция, вж. и ЕТ₅₀.

Неопределена доза: Количеството изпитван химикал, приложено върху *епидермиса* превишаващо необходимото количество за пълно и равномерно покриване на повърхността на *епидермиса*.

Смес: Смес или разтвор, съставен от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

МТТ: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид; Тиазолил син тетразолиев бромид.

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

NSC_{killed}: Неспецифичен цвят в умъртвени тъкани.

NSC: Неспецифичен цвят в живи тъкани.

NSMTT: Неспецифична редукция на МТТ.

Стандарти за ефективност (СЕ): стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който по своя механизъм и функционално е сходен с валидирания метод. Включени са: i) съществени компоненти на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтни химикали, подбрани между химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (9).

ПК: Положителна контрола, повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (9).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (9).

Заместващо изпитване: изпитване, предназначено да замести изпитване, което се използва рутинно и е прието за определяне на опасността и/или оценка на риска, и за което е установено, че предоставя равностойна или по-добра защита на здравето на хората или животните или на околната среда, според приложимото, в сравнение с приетото изпитване за всички възможни изпитвани ситуации и химикали (9).

Серия: Серията обхваща един или повече изпитвани химикали, подложени на паралелно изпитване с отрицателни контроли и с ПК.

Чувствителност: делът на всички положителни/активни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (9).

Кожно дразнене *in vivo*: предизвикването на обратимо увреждане на кожата вследствие на прилагането на изпитван химикал за период от време до 4 часа. Кожното дразнене е локално възникваща реакция на засегнатата кожна тъкан и се проявява в кратък срок след стимулация (38). Причинява се от локална възпалителна реакция, включваща вродената (неспецифична) имунна система на кожната тъкан. Главната му характеристика е обратимият процес, който включва възпалителни реакции и повечето от клиничните признаци на дразнене (еритем, оток, сърбеж и болка), свързани с възпалителен процес.

Специфичност: делът на всички негативни/неактивни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на метода за изпитване (9).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всякакви добавки, необходими за запазване на стабилността му, както и всякакви онечиствания, произтичащи от използваната технология, но с изключение на разтворители, които могат да бъдат отделени, без да се засегне стабилността на веществото или да се промени съставът му.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване..

УВЕТХ: Ултра високоефективна течна хроматография.

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Допълнение 2

МОДЕЛИ НА ИЗПИТВАНЕ, ВКЛЮЧЕНИ В НАСТОЯЩИЯ МЕТОД НА ИЗПИТВАНЕ

№	Наименование на модела на изпитване	Тип на изследването за валидиране	Препратки
1	EpiSkin™	Пълно прогнозно изследване за валидиране (2003 г.-2007 г.). Компонентите на този модел бяха използвани за определяне на съществените компоненти на метода на изпитване на оригиналните и актуализирани Стандарти за ефективност (СЕ) на ECVAM (39) (40) (21)*. Освен това, данните от метода свързани с определянето на неклаифицирани и класифицирани вещества, съставиха основата за определяне на стойностите за специфичност и чувствителност на оригиналните СЕ*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (оригинален): Първоначално моделът на изпитване премина през пълно прогнозно валидационно проучване заедно с № 1 от 2003 г. - 2007 г. Компонентите на този модел бяха използвани за определяне на съществените компоненти на методите на изпитване на оригиналните и актуализирани Стандарти за ефективност (СЕ) на ECVAM (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): Модификация на оригиналния EpiDerm™ бе валидирана като бяха използвани оригиналните СЕ на ECVAM (21) през 2008 г.*	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	изследване за валидиране , базирано на оригиналните Стандарти за ефективност на ECVAM (21) през 2008 г.*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	изследване за валидиране (2011 г. - 2012 г.) базирано на Стандартите за ефективност (СЕ) на ОИСП TG 439 (8), които са базирани на актуализираните СЕ на ECVAM* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) и СЕ на настоящите TG (8)*

*) Оригиначните Стандарти за ефективност на ECVAM (СЕ) (21) бяха разработени през 2007 г. след завършване на прогнозното изследване за валидиране (16), което беше оценило ефективността на модели за изпитване № 1 и 2 по отношение на класификационната система, описана в 28^{-то} изменение на Директивата на ЕС за опасните вещества (41). През 2008 г. бяха въведени GHS на ООН (1) и CLP на ЕС, ефективно измествайки граничната стойност за разграничаване на неклаифицираните от класифицираните вещества от *in vivo* оценка 2,0 на 2,3. За да се приспособят към това променено регулаторно изискване, през 2009 г. бяха актуализирани стойностите за точност и списъкът на референтните химикали от СЕ на ECVAM (2) (39) (40). Както оригиналните СЕ, така и актуализираните СЕ бяха като цяло базирани на данни от модели № 1 и 2 (16), но допълнително бяха използвани данни за референтните химикали от модел № 3. През 2010 г., актуализираните СЕ на ECVAM бяха използвани за определяне на СЕ, отнасящи се за настоящите TG (8). За целите на настоящия метод за изпитване,

EpiSkin™ се разглежда като VRM, поради факта, че той беше използван за разработване на всички критерии на СЕ. Подробна информация за изследванията за валидиране, комплектка на генерираните данни, както и контекст към необходимите адаптации на СЕ в резултат от внедряването на GHS на ООН/CLP могат да бъдат намерени в обяснителния справочен документ на ECVAM/BfR към съответните TG 439 на ОИСР (23).

SIT: Изпитване за кожно дразнене

RHE: Реконструиран човешки епидермис

Допълнение 3

ПАРАМЕТРИ НА ПРОТОКОЛА, СПЕЦИФИЧНИ ЗА ВСЕКИ ОТ МОДЕЛИТЕ НА ИЗПИТВАНЕ, ВКЛЮЧЕНИ В НАСТОЯЩИЯ МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ

Моделите с използване на RhE показват особено сходни протоколи и може да се отбележи, че всички използват постинкубационен период от 42 часа (32) (33) (34) (35). Вариациите засягат основно три параметъра, свързани с различните бариерни функции на моделите на изпитване и изброени тук: А) прединкубационно време и обем, Б) Прилагане на изпитвани химикали и В) Постинкубационен обем.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
А) Пред-инкубация				
Време на инкубация	18-24 часа	18-24 tuntia	< 2 часа	15-30 tuntia
Среден обем	2ml	0,9ml	0,3 или 1ml	0,5ml
Б) Прилагане на изпитвания химикал				
За течности	10µl (26µl/cm²)	30µl (47µl/cm²)	16µl (32µl/cm²)	25µl (83µl/cm²)
За твърди вещества	10mg (26mg/cm²) + DW (5µl)	25mg (39mg/cm²) + DPBS (25µl)	16mg (32mg/cm²) + DW (10µl)	25mg (83mg/cm²) + DW (25µl)
Използване на найлонова мрежа	Не се използва.	Ако е необходимо	Приложено	Не се използва.
Общо време на приложение	15 минути	60 минути	42 минути	15 минути
Температура на приложение	СТ	а) при СТ за 25 минути б) при 37°C за 35 минути	СТ	СТ
В) Постинкубационен обем				
Среден обем	2 ml	0,9ml x 2	2 ml	1 ml
Г) Максимална приемлива изменчивост				
Стандартно отклонение между тъканните повторения	SD18	SD18	SD18	SD18

СТ: стайна температура

DW: дестилирана вода

DPBS: Фосфатно буфериран физиологичен разтвор на Дюлбеко

Допълнение 4

КЛЮЧОВИ ПАРАМЕТРИ И КРИТЕРИИ ЗА ПРИЕМАНЕ ЗА КВАЛИФИЦИРАНЕ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНА СИСТЕМА С ВЕТХ/УВЕТХ ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА МТТ ФОРМАЗАН, ИЗВЛЕЧЕН ОТ ТЪКАНИ, СЪСТАВЕНИ ОТ RHE

Параметър	Протокол, извлечен от Ръководството на FDA (36)(37)	Критерии за приемливост
Избирателност	Анализ на изопропанол, жива празна проба (изопропанолов екстракт от живи тъкани от RhE без каквото и да било третиране), мъртва празна проба (изопропанолов екстракт от умъртвени тъкани от RhE, без каквото и да било третиране)	Площинтерференция $\leq$ 20% от площта _{LLOQ} ¹
Прецизност	Качествени контроли (т.е. МТТ формазан с концентрация 1.6 µg/ml, 16 µg/ml и 160 µg/ml) в изопропанол (n=5)	CV $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ
Точност	Качествени контроли в изопропанол (n=5)	%откл. $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ
Матричен ефект	Качествени контроли в жива празна проба (n=5)	85% $\leq$ Матричен ефект % $\leq$ 115%
Процент на пренасяне	Анализ на изопропанол съгласно ULOQ ² стандарта	Площинтерференция $\leq$ 20% от площта _{LLOQ}
Възпроизводимост (в рамките на деня)	3 независими калибрационни криви (базирани на 6 последователни 1/3 разреждания на МТТ формазан в изопропанол, като се започне от ULOQ, т.е. 200 µg/ml); Качествени контроли в изопропанол (n=5)	Калибрационни криви: %откл. $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ
Възпроизводимост (между различни дни)	Ден 1 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 2 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 3 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3)	Качествени контроли: %откл. $\leq$ 15% и CV $\leq$ 15%
Краткосрочна стабилност на МТТ формазан в тъканен екстракт от RhE	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след 24 часа съхранение при стайна температура	%откл. $\leq$ 15%
Дългосрочна стабилност на МТТ формазан в тъканен екстракт от RhE, ако се изисква	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след няколко дни съхранение при посочена температура (напр. 4°C, -20°C, -80°C)	%откл. $\leq$ 15%

¹LLOQ: Долна граница на количествено определяне, дефинирана да обхваща 1-2% жизнеспособност на тъканта, т.е. 0,8 µg/ml.

²ULOQ: Горна граница на количествено определяне, дефинирана да бъде най-малко два пъти по-висока от най-високата очаквана концентрация на МТТ формазан в изопропанолови екстракти от отрицателни контроли т.е. 200 µg/ml.“

(8) в Част Б, се добавят следните глави:

„Б.63 СКРИНИНГОВО ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РЕПРОДУКЦИЯТА /РАЗВИВАЩИЯ СЕ ОРГАНИЗЪМ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 421 (2016). Насоките на ОИСП за изпитване на химикали се преразглеждат периодично в светлината на научния прогрес. Оригиналните насоки за скринингово изпитване 421 бяха приети през 1995 г., на базата на протокол за „Предварително скринингово изпитване за токсичност на репродукцията“, обсъден на две експертни срещи в Лондон през 1990 г. (1) и в Токио през 1992 г. (2).
2. Този метод за изпитване бе актуализиран с крайни точки, относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система, като последващо действие към дейност с висок приоритет, иницирана в ОИСП през 1998 г. за ревизиране на съществуващите насоки за изпитвания и за разработване на нови насоки за изпитвания за скрининг и изпитване на веществата с потенциал да нарушават функцията на ендокринната система (3). TG 407 на ОИСП (28-дневно изследване за токсичност с повтаряща се орална доза при гризачи, Глава Б.7 от настоящото приложение) например, бяха подобрени през 2008 г. с параметри, подходящи за откриване на въздействие на изпитваните химикали върху ендокринната система. Целта при актуализиране на TG 421 бе да се включат някои крайни точки, относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система в насоките за скринингови изпитвания (TG), при които периодите на експозиция обхващат някои от чувствителните периоди по време на развитието на организма (пред- или ранните постнатални периоди).
3. Избраните допълнителни крайни точки относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система, също част от TG 443 (Разширено изследване за токсичност на репродукцията в едно поколение, Глава Б.56 от настоящото приложение), бяха включени в TG 421 на базата на проучване на осъществимостта разглеждащо научни и технически въпроси, свързани с тяхното включване, както и възможните адаптации на плана на изпитването, необходими за тяхното включване (4).
4. Настоящият метод за изпитване е проектиран да генерира ограничена информация относно ефектите на изпитвания химикал върху мъжката и женската репродуктивна ефективност като например, функция на половите жлези, поведение при чифтосване, зачеване, развитие на заченатия организъм и раждане. Той не е алтернативен на, нито замества съществуващите методи за изпитване Б.31, Б.34, Б.35 или Б.56.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

5. Настоящият метод за скрининг изпитване може да се използва за предоставяне на първоначална информация за възможните ефекти върху репродукцията и/или развитието, в ранния етап на оценяване на токсикологичните свойства на химикали, или за химикали, които пораждат безпокойство. Той може да се използва и като част от набор от първоначални скрининг изпитвания за съществуващи химикали, за които има малко или липсва токсикологична информация, като проучване за определяне на диапазона на дозата за по-обширни проучвания върху репродукцията/развитието, или когато се счете за уместно по други причини. При провеждане на проучването следва да се спазват ръководните принципи и съображения, очертани в Ръководство на ОИСП № 19 относно признаването, оценката и употребата на клинични признаци като хуманни крайни точки за експериментални животни, използвани за оценяване на безопасността (5).
6. Настоящият метод за изпитване не предоставя пълна информация по всички аспекти на репродукцията и развитието на организма. По-конкретно, той предлага единствено ограничени средства за откриване на постнатални прояви на пренатална експозиция, или ефекти, които може да бъдат индуцирани по време на постнатална експозиция. Наред с другите причини, поради относително малкия брой животни в групите на определена доза, избирателността на крайните точки и кратката продължителност на проучването, този метод няма да предостави доказателство за категорични твърдения за липса на ефекти. Нещо повече, при отсъствието на данни от други изследвания за токсичност на репродукцията/развиващия се организъм, положителните резултати са полезни за първоначалната оценка на опасността и допринасят за вземането на решения по отношение на необходимостта и времето за допълнителни изпитвания.
7. Резултатите, получени от свързаните с жлезите с вътрешна секреция параметри, следва да се разглеждат в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (6). В тази Концептуална рамка подобрените TG 421 на ОИСП се съдържат в ниво 4 като *in vivo* изследване, предоставящо данни за неблагоприятните ефекти върху крайните точки, относими към ендокринната система. Все пак, един ендокринен сигнал сам по себе си не може да се разглежда като достатъчно доказателство, че изпитваният химикал е вещество, нарушаващо функциите на ендокринната система.
8. Настоящият метод за изпитване предполага орален прием на изпитвания химикал. Ако се използват други пътища на експозиция може да се налагат изменения на метода.
9. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той

може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

10. Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Изпитваният химикал се прилага в нарастващи дози на няколко групи от мъжки и женски индивиди. Мъжките следва да бъдат дозирани в продължение на най-малко четири седмици до и включително деня, преди планираното им умъртвяване (това включва минимум две седмици преди чифтосване, по време на периода на чифтосване и приблизително, две седмици след чифтосване). Предвид ограничения период на дозиране на мъжките преди чифтосване, плодовитостта може да не бъде особено чувствителен показател за тестикуларна токсичност. Ето защо, детайлно хистологично изследване на тестисите е от съществено значение. Комбинацията от период на дозиране преди чифтосване от две седмици и последващи наблюдения на чифтосването/плодовитостта с цялостния период на дозиране от минимум четири седмици, последван от детайлни хистопатологични изследвания на мъжките полови жлези, се разглежда като достатъчен за да могат да бъдат определени голяма част от ефектите върху мъжката плодовитост и сперматогенеза.
12. Женските следва да бъдат дозирани през целия период на проучването. Това включва две седмици преди чифтосване (като целта е да се обхванат най-малко два пълни естрални цикъла), променливото време до зачеване, продължителността на бременността и най-малко тринадесет дни след раждането, до и включително деня, преди планираното им умъртвяване.
13. Продължителността на проучването, след аклиматизацията и оценката на естралния цикъл преди дозиране, зависи от женската ефективност и е приблизително 63 дни, [най-малко 14 дни преди чифтосването, (до) 14 дни за чифтосване, 22 дни бременност, 13 дни лактация].
14. По време на периода на прилагане, животните се наблюдават внимателно и ежедневно за признаци на токсичност. Животните, които умират или са умъртвени по време на периода на изпитването, се аутопсират, а преживелите животни се умъртвяват и се аутопсират при приключването на изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Избор на животински вид

15. Настоящият метод за изпитване е предназначен за употреба с плъхове. Ако параметрите, определени в рамките на този метод за изпитване, се изследват при друг вид гризачи, следва да бъде представена детайлна обосновка. Плъховете са единственият биологичен вид, използван в рамките на международната валидационна програма за откриване на вещества, нарушаващи функциите на ендокринната система в TG 407 на ОИСП (съответстващи на Глава Б.7 от настоящото приложение). Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост или породи, за които е характерна висока честота на вродените аномалии. Трябва да се използват здрави, нераждали животни, които не са били подлагани на предишни експериментални процедури. Тестовите животни следва да се охарактеризират по вид, порода, пол, тегло и възраст. При започване на изследването измененията в теглото на използваните животни следва да бъде минимално и да не надвишава 20% от средното за всеки пол тегло. Когато изследването се провежда като предварително до дългосрочно проучване или проучване на цяло поколение, за предпочитане е в двете изследвания да се използват животни от една и съща порода и източник.

Условия на отглеждане и хранене

16. Всички процедури трябва да са в съответствие с местните стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C ($\pm 3^\circ$). Въпреки че относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по настоящия метод.

17. Животните се настаняват групово, в малки групи от един и същи пол; животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано. При групово настаняване в клетки не следва да има повече от пет животни в клетка. Чифтосването трябва да се извърши в клетки, подходящи за тази цел. Бременните женски следва да бъдат настанявани поотделно и да им бъдат предоставяни материали за изграждане на гнездо. Кърмещите женски се настаняват поотделно заедно с потомството си.

18. Храната следва да бъде редовно анализирана за наличието на замърсители. Проба от хранителния режим трябва да се съхранява до окончателното изготвяне на доклада.

Подготовка на опитните животни

19. Здрави млади полово зрели животни се определят на произволен принцип за контролните и опитните групи. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Животните се идентифицират по уникален начин и се настаняват в клетките им най-малко пет дни преди началото на проучването, за да им се осигури време за аклиматизиране към лабораторните условия.

Приготвяне на дозите

20. Препоръчително е изпитваният химикал да се прилага орално, освен ако други пътища на приложение не бъдат определени като по-подходящи. При избор на оралния път, изпитваният химикал обикновено се прилага с помощта на сонда; въпреки това, друга възможност за приложение на изпитваните химикали е чрез хранителната диета или питейната вода.
21. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това — разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — разтваряне в други носители. При работа с носители, различни от вода, трябва да бъдат известни токсичните характеристики на съответния носител. Трябва да се определят стабилността и хомогенността на изпитвания химикал в носителя.

ПРОЦЕДУРА

Брой и пол на животните

22. Препоръчително е в началото всяка група да е с най-малко 10 мъжки и 12-13 женски индивида. Женските се оценяват преди експозицията за естрална цикличност и животните, които не проявят типичните 4-5-дневни цикли не се включват в проучването; това е причината за препоръчителния допълнителен брой женски, с цел да се отделят по 10 женски в група. Освен в случай на ясно изразени токсични ефекти, в резултат от това се очаква да има най-малко 8 бременни женски в група, което обикновено е минималния приемлив брой бременни женски на група. Целта е да се постигнат достатъчно бременности и потомство, за да се гарантира значима оценка на потенциала на изпитвания химикал да оказва влияние върху плодовитостта, бременността, поведението на майката и кърменето, и растежа, и развитието на поколение F₁ от зачатието до ден 13 след раждането.

Дозиране

23. Обикновено се използват поне три опитни групи и една контролна. Нивата на дозиране може да се базират на информацията от изпитванията за остра токсичност или на резултатите от изследванията с повторна доза. С изключение на третиране с

изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано количество носител.

24. Нивата на дозиране следва да бъдат подбрани така, че да вземат отчетат всички съществуващи и налични данни за токсичност и (токсико-) кинетика. Следва да се вземе предвид и факта, че може да съществуват различия в чувствителността на бременни и не-бременни животни. Целта при избор на най-високото ниво на доза е индуциране на токсични ефекти, но не смърт или силно страдание. След това следва да се избере последователност с намаляващи нива на дозиране с цел демонстриране на всеки отклик, свързан с дозирането и достигане на най-ниското ниво на дозиране, при което не се наблюдават неблагоприятни ефекти (NOAEL). За определяне на последователно намаляващите нива на доза в повечето случаи е най-подходящо всяка доза да намалява два до четири пъти спрямо най-близката по-висока доза, а добавянето на допълнителна четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти).
25. При наличие на наблюдения за обща токсичност (напр. намалено телесно тегло, ефекти върху черния дроб, сърцето, белите дробове или бъбреците и др.) или други промени, които може да не бъдат токсични реакции (напр. намален прием на храна, уголемяване на черния дроб), наблюдаваните ефекти върху ендокринни чувствителни крайни точки следва да се тълкуват предпазливо.

Гранично изпитване

26. Ако орално изследване с ниво на една доза от най-малко 1000 mg/kg телесно тегло/ден или при приложение с храната или питейната вода с доза, която е еквивалентен процент в храната или питейната вода, като се използват процедурите, описани в настоящото изследване, не доведе до забележими токсични ефекти и, ако въз основа на данните от структурно свързани вещества не се очаква токсичност, тогава пълно изследване с използване на няколко нива на дозиране може да не се счита за необходимо. При лимитиращото изпитване може да се приложи и по-висока орална доза, когато това се налага във връзка с нивото на експозиция за населението. За другите видове приложения, като например инхалация или дермално приложение, физикохимичните свойства на изпитваните химикали често предполагат използване на максимално постижимата концентрация.

Прилагане на дозите

27. Животните се дозират с изпитвания химикал в продължение на 7 дни в седмицата. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, това следва да

става чрез еднократна доза за животното през стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът не следва да превишава 1 ml/100 g т.м., освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори. Тогава обемът може да достигне 2 ml/100 g т.м. С изключени на дразнещите или корозивни изпитвани химикали, които обикновено водят до засилени ефекти при повисоки концентрации, промените в изпитвания обем следва да бъдат сведени до минимум чрез коригиране на концентрацията, за да се гарантира постоянен обем при всички нива на дозиране.

28. За изпитван химикал, прилаган с храната или питейната вода, е важно да се гарантира, че количествата на приложения изпитван химикал не пречат на нормалния хранителен или воден баланс. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим, могат да бъдат използвани постоянна хранителна концентрация (ppm) или постоянно ниво на доза спрямо телесното тегло на животното; използваната алтернатива следва да бъде описана. За изпитван химикал, прилаган с помощта на сонда, дозата следва да бъде прилагана в сходни моменти всеки ден, и коригирана най-малко веднъж седмично, за да се поддържа постоянно ниво на дозиране, предвид телесното тегло на животното.

Експериментален график

29. Дозирането на двата пола следва да започне най-малко 2 седмици преди чифтосване, след като животните са аклиматизирани в продължение на най-малко пет дни и женските са били скринирани за нормален естрален цикъл (в рамките на 2-седмичния период преди третиране). Изследването следва да бъде планирано по такъв начин, че оценката на естралния цикъл да започне скоро след като животните навършат пълна полова зрялост. Това може леко да варира за различните породи плъхове в различни лаборатории, напр. плъхове Sprague Dawley - 10-седмична възраст, плъхове Wistar - около 12-седмична възраст. Майките и потомството следва да бъдат умъртвени на ден 13 след раждането, или скоро след това. Денят на раждането (тоест, когато раждането завърши) се определя като ден 0 след раждането. Женските, които не показват признаци за копулация се умъртвяват 24-26 дни след последния ден от периода за чифтосване. Дозирането продължава за два пола по време на периода за чифтосване. Мъжките следва да бъдат допълнително дозирани след периода за чифтосване, най-малкото докато завърши минималния общ период за дозиране от 28 дни. След това се умъртвяват или друга възможност е да се запазят и да продължат да бъдат дозирани за евентуално провеждане на второ чифтосване, ако това се счете за уместно.
30. Ежедневното дозиране на женските майки следва да продължи през цялата бременност и най-малко до и включително ден 13 след раждането или до деня преди

пожертването им. За изследвания, при които изпитваният химикал се прилага чрез инхалация или по дермален път, дозирането следва да продължи най-малко до и включително 19 ден от бременността, и да се възобнови възможно най-скоро и не по-късно от 4 ден след раждането (PND).

31. Схема на експерименталния график е дадена в допълнение 2.

Процедура на чифтосването

32. В настоящото изследване обикновено следва да се използва чифтосване 1:1 (един мъжки с една женска). Изключения могат да възникнат в случай на непредвидена смърт на мъжките. Женските индивиди следва да бъдат поставени заедно с мъжкия, докато не бъде забелязано доказателство за копулация или до изтичането на две седмици. Всяка сутрин женските следва да бъдат преглеждани за наличие на сперма или вагинална запушалка. Ден 0 от бременността се определя като деня, в който е потвърдено доказателството за чифтосване (откриване на вагинална запушалка или сперма). Когато чифтосването е неуспешно, може да се извърши повторно чифтосване на женските животни с мъжки животни с доказан фертилитет от същата опитна група.

Брой на животните в котилото

33. На ден 4 след раждането, броят на животните във всяко котило може да се коригира като се елиминират излишните новородени чрез произволна селекция, за да се постигне, доколкото е възможно, по четири или пет новородени от един пол в котило, в зависимост от нормалния брой на животните в котилото за използваната порода плъхове. От две от излишните новородени следва да се вземат кръвни проби, които да се обединят и използват за определяне на серумните нивата на Т4. Селективно елиминиране на новородени, напр. въз основа на телесното тегло, или разстоянието между ануса и половите органи (РАПО) не е уместно. Когато броят на мъжките или женските новородени не позволява отделяне по четири или пет от един пол във всяко котило, е приемливо частично коригиране (например, шест мъжки и четири женски). Няма да се елиминират новородени, когато броят на животните в котилото падне под целта за бракуване (8 или 10 новородени/котило). Ако има само едно новородено над целта за бракуване, само едно новородено ще бъде бракувано и използвано за вземане на кръв за евентуални оценки на серумните нива на Т4.

34. Ако броят на животните в котилото не се коригира, на ден 4 след раждането се жертват две новородени на котило и се вземат кръвни проби за измерване на серумните концентрации на тироидния хормон. Ако е възможно, двете новородени на котило, следва да бъдат женски, с цел да се резервират мъжки новородени за оценка на запазването на зърната на млечните жлези, с изключение на случая, когато при премахването на тези новородени не остават женски за оценяване при

прекръпяване на изпитването. Когато броят на животните в котилото падне под 8 или 10 новородени/котило (в зависимост от нормалния брой на животните в котилото при използваната порода плъхове), няма да се елиминират новородени. Ако има само едно новородено над нормалния брой на животните в котилото, само едно новородено ще бъде елиминирано и използвано за вземане на кръв за евентуални оценки на серумните нива на Т4.

Интравитални наблюдения

Клинични наблюдения

35. По време на периода на изпитване следва да бъдат извършвани общи клинични наблюдения минимум веднъж на ден и по-често, когато бъдат забелязани признаци на токсичност. За предпочитане е те да се правят по едно и също време всеки ден, като се има предвид пиковия период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Следва да се записват относимите промени в поведението, признаци за трудно или удължено раждане, както и всички признаци за токсичност, включително смъртност. Тези записи следва да включват часа на започване, степента и продължителността на признаците за токсичност.

Телесно тегло и консумация на храна/вода

36. Мъжките и женските следва да се претеглят на първия ден от дозирането, и минимум всяка седмица след това, както и при прекръпяване на изследването. По време на бременност, женските следва да се претеглят на дни 0, 7, 14 и 20, и в рамките на 24 часа след раждането (ден 0 или 1 след раждането) и минимум на ден 4 и 13 след раждането. Тези наблюдения трябва да се описват индивидуално за всяко полово зряло животно.
37. По време на периода преди чифтосването, бременността и кърменето, консумацията на храна следва да се измерва най-малко веднъж седмично. Измерването на консумацията на храна по време на чифтосване е незадължително. Консумацията на вода по време на тези периоди също следва да се измерва, когато изпитваният химикал се прилага с питейната вода.

Естрални цикли

38. Естралните цикли следва да бъдат наблюдавани преди да започне третирането, за да се подберат за изследването женски с редовна цикличност (вж. точка 22). Вагиналните натривки следва също да се наблюдават ежедневно от началото на периода на третиране до потвърждение за чифтосване. Ако има притеснения за ефекти на остър стрес, които биха могли да променят естралните цикли с началото на дозирането, лабораториите могат да изложат тестовите животни за 2 седмици, след което да вземат вагинални натривки ежедневно и да следят естралния цикъл в продължение на минимум две седмици по време на периода преди чифтосване, като

наблюдението да продължи и през периода на чифтосване, докато бъде открито потвърждение за чифтосване. Вземането на клетки от влагалището/цервикса следва да бъде внимателно, за да се избегне увреждане на лигавицата, което може индуцира псевдобременност (7) (8).

Показатели за потомството

39. Продължителността на бременността следва да бъде записвана и изчислявана от ден 0 от бременността. Всяко котило следва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането, за да се установи броя и пола на новородените, броя на мъртвородените, живородените, изтърсаците (новородени, които са значително по-малки от съответните контролни новородени) и наличието на макроскопски аномалии.
40. Живите новородени следва да се преброят и да им се определи пола, а котилата да се претеглят в рамките на 24 часа след раждането (ден 0 или 1 след раждане) и поне на ден 4 и 13 след раждането. В допълнение към наблюденията, описани в точка 35, следва да се запише всяко аномално поведение на потомството.
41. РАПО разстоянието следва да се измери на същия ден след раждането между PND 0 до PND 4. Телесното тегло на новороденото следва да бъде измерено в деня на измерване на РАПО, и стойността на РАПО следва да бъде нормализирана към размера на новороденото, за предпочитане към кубичния корен от телесното тегло (9). Броят на зърната/ареолите на гърдите на мъжките новородени следва да се преброи на PND 12 или 13, както се препоръчва в GD 151 на ОИСП (10).

Клинична биохимия

42. От определено място се вземат кръвни проби на базата на следния график:
 - от поне две новородени на котило, на ден 4 след раждането, ако броят на новородените го позволява (вж. точки 33-34)
 - от всички майки и поне от две новородени на котило при прекратяването на ден 13, и
 - от всички зрели мъжки, при прекратяването,

Всички кръвни проби се съхраняват при подходящи условия. Кръвните проби от новородените на ден 13 и от зрелите мъжки се оценяват за серумни нива на тироидните хормони (Т4). Ако е уместно се прави допълнителна оценка на Т4 в кръвните проби от самките и новородените на ден 4. Също ако е уместно, може да се извърши незадължително измерване на други хормони. Кръвта на новородените може да се обедини по котила за анализите на тироидния хормон. За предпочитане е тироидните хормони (Т4 и ТSH) да се измерват като 'общи'.

43. Следните фактори могат да повлияят на варирането и на абсолютните концентрации при определянето на хормони:

- времето на умъртвяване, поради дневните колебания в концентрацията на хормони
- методът на умъртвяване, за да се избегне ненужен стрес за животните, който може да повлияе на концентрациите на хормони
- комплектите за изпитване за определяне на хормони, които могат да се различават по стандартните си криви.

44. Пробите от плазма, специално предназначени за определяне на хормони, следва да бъдат получени в сравними периоди през деня. Числовите стойности, получени при анализа на концентрации на хормони, се различават при употребата на различни търговски комплекти за анализ.

Патология

Макроскопска аутопсия

45. В момента на умъртвяване или смърт по време на изследването, следва да се извърши макроскопски оглед на възрастните животни за всякакви аномалии или патологични изменения. Особено внимание при огледа трябва да се обърне на органите на половата система. Броят на местата за имплантация следва да бъде записан. Вагиналните натривки следва да бъдат изследвани на сутринта в деня на аутопсия, за да се определи стадия на естралния цикъл и да се даде възможност за корелация с хистопатологичното изследване на яйчниците.

46. Тестисите и епидидимите, както и простатата и семенните мехурчета с коагулиращите жлези като цяло трябва да бъдат изрязани от всички мъжки зрели животни и почистени от прилежащите тъкани, според необходимостта, и трябва да се претеглят в мокро състояние възможно най-скоро след дисекцията, за да не се допусне изсъхването им. В допълнение, опционалното тегло на органите може да включва мускула повдигач на ануса плюс булбокавернозни мускулен комплекс, жлезите на Каупър и главичката на пениса при мъжките и двойката яйчници (мокро тегло) и матката (включително маточната шийка) при женските; ако са включени, тези тегла следва да бъдат взети възможно най-скоро след дисекцията.

47. Мъртвите новородени и новородените, умъртвени на ден 13 след раждането или скоро след това, трябва най-малко да бъдат внимателно огледани външно за макроскопски аномалии. Особено внимание следва да се обърне външните репродуктивни полови органи, които да се огледат за признаци на променено развитие. На ден 13 трябва да се запази щитовидната жлеза от 1 мъжко и 1 женско новородено на котило.

48. Яйчниците, тестисите, допълнителните полови органи (матката и шийката на матката, епидидимите, простатата, семенните мехурчета плюс коагулиращите жлези), щитовидната жлеза и всички органи показващи макроскопски лезии на всички възрастни животни следва да бъдат запазени. Фиксация във формалин не се препоръчва за рутинно изследване на тестиси и епидидими. Приемлив метод за тези тъкани е използването на фиксаж на Буен или модифициран Дейвидсън (11). Бялото покривало (tunica albuginea) може внимателно да се пробие на неголяма дълбочина в двата края на органа с помощта на игла, за да се позволи бързо проникване на фиксатора.

Хистопатология

49. Подробно хистопатологично изследване следва да бъде направено на яйчниците, тестисите и епидидимите (със специален акцент върху етапите на сперматогенеза и хистопатология на интерстициалната тестикуларна клетъчна структура) на животните от групата, третирана с най-висока доза и контролната група. Другите запазени органи, включително щитовидната жлеза от новородени и възрастни животни могат да бъдат изследвани, когато е необходимо. Теглото на щитовидната жлеза може да се установи след фиксация. Почистването също следва да се осъществи много внимателно и само след фиксиране, за да се избегне увреждане на тъканите. Увреждането на тъканите може да постави под съмнение хистопатологичния анализ. Изследванията следва да обхванат и животните от групи с други нива на дозата, ако бъдат забелязани промени в групата, третирана с най-висока доза. В Указанията за хистопатология (11) се съдържа допълнителна подробна информация относно дисекцията, фиксирането, разрязването и хистопатологията на ендокринните тъкани.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

50. Следва да бъдат осигурени индивидуални данни за всяко животно. Допълнително, всички данни следва да бъдат обобщени в таблична форма, показвайки за всяка изпитвана група броя на животните в началото на изпитването, броя на животните открити мъртви по време на изпитването или умъртвени по хуманни причини, времето на смъртта или хуманното умъртвяване, броя на плодовитите животни, броя на бременните женски, броя на животните показващи признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на началото, продължителността и сериозността на всички токсични ефекти, видовете хистопатологични изменения и всички относими данни за котилото. Табличен формат на обобщено протоколиране, който се е доказал като особено полезен за оценката на ефекта върху репродукцията /развитието, е даден в допълнение 3.

51. Поради ограничените размери на изследването, статистически анализи във формата на изпитвания за "значимост" са с ограничена стойност за много крайни точки, и особено за крайните точки на репродукцията. Ако се използват статистически анализи, тогава избраният метод следва да бъде подходящ за разпределението на изследваната променлива и да бъде избран преди началото на изследването. Статистическият анализ на РЕПО и запазването на зърната на млечните жлези трябва да бъде базиран на индивидуални данни за новороденото, като взема под внимание ефектите на котилото. Където е уместно, котилото е единицата за анализ. Статистическият анализ на телесното тегло на новороденото трябва да бъде базиран на индивидуални данни за новороденото, като взема под внимание броя на животните в котилото. Поради малкия размер на групите, използването на контролни данни от предходни периоди (напр. за брой на животните в котилото), когато са налични, могат също да бъдат полезни като спомагателно средство за интерпретиране на изследването.

Оценка на резултатите

52. Констатациите на това изследване за токсичност следва да бъдат оценени като се вземат предвид наблюдаваните ефекти, аутопсията и микроскопските находки. Оценката включва връзката между дозата на изпитвания химикал и наличието или отсъствието, разпространението и сериозността на аномалиите, включително макроскопски лезии, идентифицирани прицелни органи, безплодие, клинични аномалии, засегната ефективност на репродукцията и на котилото, промени в телесното тегло, ефекти върху смъртността и всякакви други токсични ефекти.

53. Поради краткия период на третиране на мъжките индивиди, хистопатологичното изследване на тестисите и епидидимите следва да се разглеждат заедно с данните за плодовитост, когато се оценяват ефектите върху мъжката репродуктивност. Използването на контролни данни от предходни периоди за репродукцията/развитието на организма (напр., относно броя на животните в котилото, РЕПО, запазване на зърната на млечните жлези, серумни нива на T4), когато са налични, могат също да бъдат полезни като спомагателно средство за интерпретиране на изследването.

54. За контрол на качеството се предлага да се събират контролни данни за минали периоди и да се изчисляват коефициенти на вариация за числовите данни, особено за параметрите, свързани с откриване на нарушители на функциите на ендокринната система. Тези данни могат да бъдат използвани за сравнение когато се извършва оценка на актуалните изследвания.

Протокол от изпитването

55. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава
- стабилност на изпитвания химикал, ако е известна.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Носител (когато се използва такъв):

- обосновка за избора на носител, когато е различен от вода.

Изпитвани животни:

- използван вид/порода,
- брой, възраст и пол на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.
- обосновка при използване на видове, различни от плъх.

Условия на изпитването:

- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробна информация за това в какъв вид е изпитваният химикал/хранителната смес, постигнати концентрации, стабилност и хомогенност на сместа;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно тегло дневно), ако е приложимо,
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробно описание на процедурата за рандомизация при подбора на новородени за бракуване, ако се прилага бракуване.

Резултати:

- телесно тегло/промени в телесното тегло;
- консумация на храна и консумация на вода, ако има налични данни;
- данни за токсичната реакция по пол и доза, включително плодовитост, бременност и всякакви други признаци на токсичност;
- продължителност на бременността;
- токсични или други ефекти върху репродукцията, потомството, постнаталния растеж и др.;
- природа, сила и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими),
- брой на възрастните женски с нормален или аномален естрален цикъл и продължителност на цикъла;
- брой на живородените и пост-имплантационни загуби;
- данни за телесното тегло на новороденото
- РЕПО на всички новородени (и телесно тегло в деня на измерване на РЕПО)
- запазване на зърната на млечните жлези при мъжките новородени,
- нива на тиреоидния хормон, новородени на ден 13 и възрастни мъжки (и самки и новородени на ден 4, ако е измерван)
- брой новородени с видими макроскопски аномалии, макроскопска оценка на външните полови органи, брой на изтърсаците;
- време на смъртта в процеса на изпитването или дали животните са преживели до края на изпитването;
- брой на имплантациите, брой на животните в котилото и тегло на котилото към момента на записване;
- телесно тегло в момента на пожертване и данни за тегло на органи за животните родители;
- находки при аутопсията;
- подробно описание на хистопатологичните находки;
- данни за абсорбция (ако има);
- статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

Обяснение на резултатите

56. Изследването предоставя оценки на токсичността на репродукцията/развиващия се организъм, свързана с приложението на повторени дози (вж. точки 5 и 6). Може да представи указание за необходимостта от провеждане на допълнителни разследвания и предоставя насоки за планиране на последващи изпитвания. Следва да се консултирате с Ръководството на ОИСП 43 за помощ при тълкуването на резултатите, свързани с репродукцията и развитието на организма (12). Ръководство № 106 на ОИСП относно Хистологичната оценка на ендокринните и репродуктивни изпитвания на гризачи (11) предоставя информация относно подготовката и оценката на (ендокринните) органи и вагиналните натривки, които могат да бъдат полезни за настоящите TG.

ЛИТЕРАТУРА

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ (ВИЖТЕ И GD 150 НА ОИСП (6))

Андрогенност е способността на даден химикал да действа като естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организма на бозайник.

Антиандрогенност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организма на бозайник.

Антиестрогенност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен естрогенен хормон (напр. естрадиол 17 β) в организма на бозайник.

Антитиреоидна активност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен тиреоиден хормон (напр. T₃) в организма на бозайник.

Химикал означава вещество или смес.

Токсичност на развиващия се организъм: проявата на репродуктивна токсичност, представляваща пред-, пери- пост-натални, структурни или функционални разстройства в потомството.

Дозировка е общ термин, обхващащ дозата, нейната честота и продължителност на дозиране.

Доза е количеството приложен изпитван химикал. Дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно), или като постоянна концентрация в храната.

Явна токсичност е общ термин, описващ ясните признаци на токсичност след прилагане на изпитвания химикал. Те следва да бъдат достатъчни за оценка на опасността и следва да бъдат такива, че при увеличаване на прилаганата доза да се очаква развитие на признаци на силна токсичност и вероятна смърт.

Увреждане на плодовитостта представлява разстройства на мъжките или женските възпроизводителни функции или способности.

Токсичност при майката: неблагоприятни ефекти върху бременните женски, възникващи или специфично (пряк ефект), или неспецифично (непряк ефект).

NOAEL е съкращение за нивото, при което не се наблюдават неблагоприятни ефекти. Това е най-високото ниво на доза, при което не се наблюдават свързани с третирането неблагоприятни находки в резултат от третирането.

Естрогенност е способността на даден химикал да действа като естествен естрогенен хормон (напр. естрадиол 17 β) в организма на бозайник.

Репродуктивна токсичност представлява вредни ефекти върху потомството и/или

увреждане на мъжките и женските възпроизводителни функции или способности.

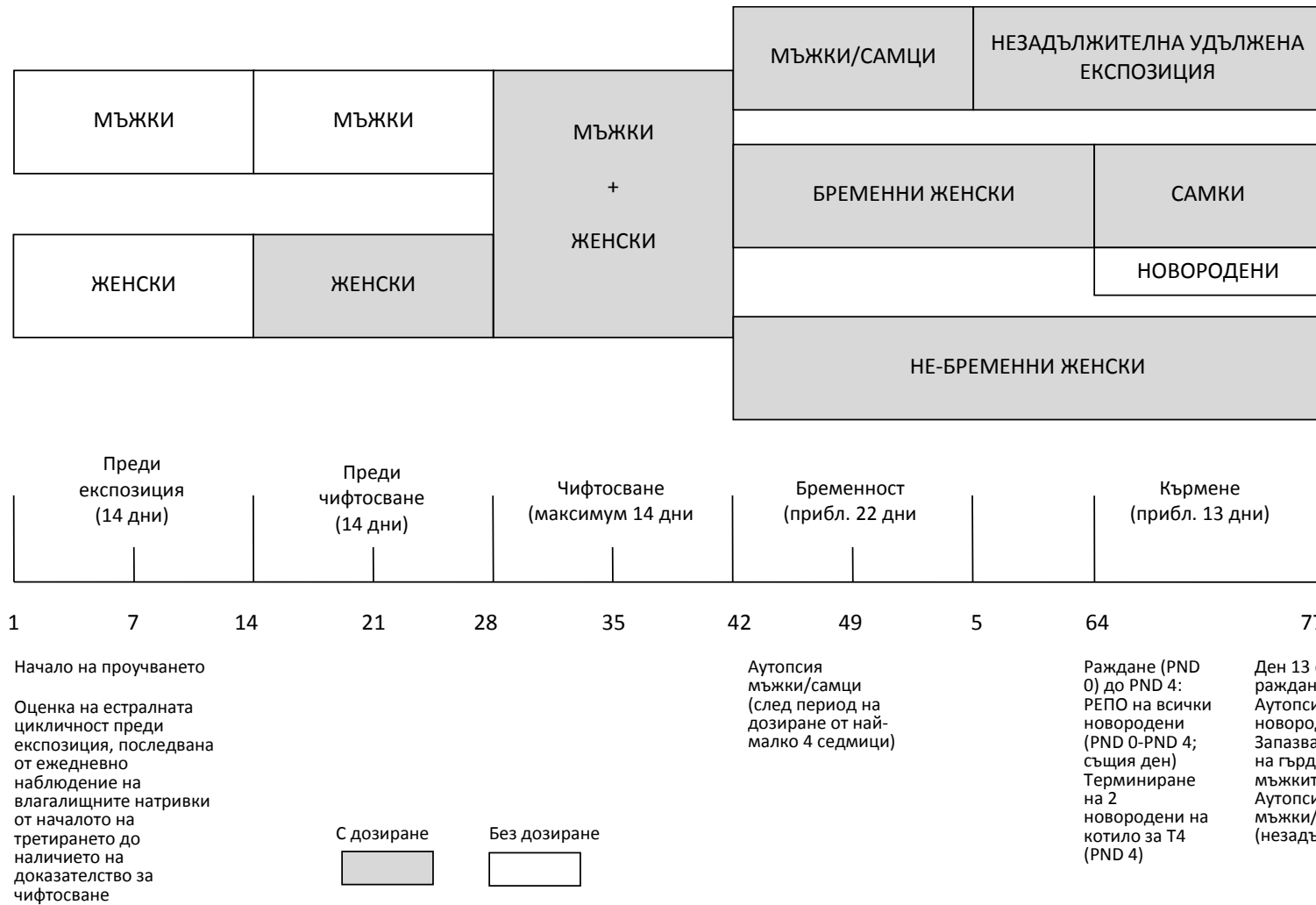
Изпитван химикал е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Тиреоидна активност е способността на даден химикал да действа като естествен тиреоиден хормон (напр. T_3) в организма на бозайник.

Валидиране е научна процедура, предназначена за характеризиране на оперативните изисквания и ограничения на даден метод за изпитване и за доказване на неговата надеждност и относимост за определена цел.

Допълнение 2

СХЕМА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИЯ ГРАФИК, УКАЗВАЩА МАКСИМАЛНАТА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО, НА БАЗАТА НА ПЪЛЕН 14-ДНЕВЕН ПЕРИОД НА ЧИФТОСВАНЕ



Допълнение 3

ОБООБЩЕН ДОКЛАД В ТАБЛИЧЕН ВИД НА ЕФЕКТИТЕ ВЪРХУ РЕПРОДУКЦИЯТА/РАЗВИТИЕТО

КОНСТАТАЦИИ И ОЦЕНКИ	Стойности				
Дозировка (единици)	0 (контрол)	.. .	.. .	.. .	.. .
Стартирани двойки (N)					
Естрален цикъл (поне средна продължителност и честота на нередовни цикли)					
Женски, показващи потвърждение за копулация (N)					
Женски, постигнали забременяване (N)					
Дни от зачатието 1 - 5 (N)					
Дни от зачатието 6 - . . . ⁽¹⁾ (N)					
Бременност ≤ 21 дни (N)					
Бременност = 22 дни (N)					
Бременност ≥ 23 дни (N)					
Самки с живородени малки (N)					
Самки с живи малки на 4 ден след раждането (N)					
Импланти/самка (средно)					
Живи новородени/самка при раждането (средно)					
Живи новородени/самка на 4 ден (средно)					
Съотношение на половете (м/ж) при раждането (средно)					
Съотношение на половете (м/ж) на 4 ден (средно)					
Тегло на животните в котилото при раждането (средно)					

⁽¹⁾ последен ден от периода на чифтосване

Тегло на животните в котилото на 4 ден (средно)					
Тегло на новороденото при раждането (средно)					
Тегло на новороденото към момента на измерване на РЕПО (средно мъжки, средно женски)					
РЕПО на новороденото на същия постнатален ден, раждане — ден 4 (средно мъжки, средно женски, отбелязване PND)					
Тегло на новороденото на 4 ден (средно)					
Запазване на зърната на млечните жлези при мъжките новородени на ден 13 (средно)					
Тегло на новороденото на 13 ден (средно)					
НОВОРОДЕНИ С АНОМАЛИИ					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с ≥ 2					
ЗАГУБА НА ПОТОМСТВО					
Пре-натално/след имплантация (имплантации минус живородени)					
Женски с 0					
Женски с 1					
Женски с 2					
Женски с ≥ 3					
Постнатално (живородени минус живи на постнатален ден 13)					
Женски с 0					
Женски с 1					
Женски с 2					
Женски с ≥ 3					

В.64 КОМБИНИРАНО ТОКСИКОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА СЪС СКРИНИНГ ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ НА РЕПРОДУКЦИЯТА/РАЗВИВАЩИЯ СЕ ОРГАНИЗЪМ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 422 (2016). Насоките на ОИСП за изпитване на химикали се преразглеждат периодично в светлината на научния прогрес. Оригиналните насоки за скрининг изпитване 422 бяха приети през 1996 г., на базата на протокол за "Комбинирано скрининг изпитване с повтаряща се доза и за токсичност на репродукцията/развиващия се организъм", обсъден на две експертни срещи в Лондон през 1990 г. (1) и в Токио през 1992 г. (2).
2. Настоящият метод за изпитване съчетава частта за скрининг за токсичност за репродукцията/развиващия се организъм, която се основава на опита, придобит от страните членки при използването на оригиналния метод върху съществуващи химикали, произвеждани в големи количества и в проучвателни изпитвания с вещества за положителна контрола (3) (4), и частта за токсичност с повтаряща се доза, в съответствие с насоките за изпитване на ОИСП 407 (28-дневно изследване за токсичност при гризачи с повтаряща се орална доза, съответстващо на Глава Б.7 от настоящото Приложение).
3. Този метод за изпитване бе актуализиран с крайни точки, относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система, като последващо действие към дейност с висок приоритет, иницирана в ОИСП през 1998 г. за ревизиране на съществуващите насоки за изпитвания и за разработване на нови насоки за изпитвания за скрининг и изпитване на веществата с потенциал да нарушават функцията на ендокринната система (5). В този контекст TG 407 (съответстващи на глава Б.7 от настоящото приложение) бяха подобрени през 2008 г. с подходящи параметри за откриване на ендокринна активност на изпитваните химикали. Целта при актуализиране на TG 422 бе да се включат някои крайни точки, относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система в насоките за скринингови изпитвания (TG), при които периодите на експозиция обхващат някои от чувствителните периоди по време на развитието на организма (пред- или ранните постнатални периоди).
4. Избраните допълнителни крайни точки, относими към вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система, също част от TG 443 (Разширено изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение, съответстващо на глава Б.56 от настоящото приложение), бяха включени в TG 422 на базата на проучване на осъществимостта, разглеждащо научни и технически въпроси, свързани с тяхното

включване, както и възможните адаптации на плана на изпитването, необходими за тяхното включване (6).

5. Настоящият метод за изпитване е проектиран да генерира ограничена информация относно ефектите на изпитвания химикал върху действието на мъжката и женската репродуктивна система, напр. функция на половите жлези, поведение при чифтосване, зачеване, развитие на заченатия организъм и раждане. Той не е алтернативен на съществуващите методи за изпитване Б.31, Б.34, Б.35 или Б.56, нито ги замества.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

6. При оценката и оценяването на токсичните характеристики на изпитван химикал след получаване на първоначалната информация за токсичността от изпитването за остра токсичност може да се извърши определяне на оралната токсичност с използване на повтаряща се доза. Това проучване предоставя информация за възможните опасности за здравето, които е вероятно да възникнат при повторна експозиция за относително ограничен период от време. Методът се състои от базово проучване за токсичност с повтаряща се доза, което може да се използва за химикали, за които 90-дневно изследване не е гарантирано (напр. когато произведеното количество не превишава определени граници) или като предварително изследване към дългосрочно проучване. При провеждане на проучването следва да се спазват ръководните принципи и съображения, очертани в Ръководство на ОИСП № 19 относно признаването, оценката и употребата на клинични признаци като хуманни крайни точки за експериментални животни, използвани за оценяване на безопасността (7).
7. Освен това то включва и скринингово изпитване за токсичност за репродукцията/развиващия се организъм и поради това може да бъде използвано за осигуряване на първоначална информация за възможните ефекти върху мъжката и женската репродуктивна способност, като например функция на половите жлези, поведение при чифтосване, зачеване, развитие на зародиша и раждане, или в ранен етап на оценка на токсикологичните свойства на изпитваните химикали, или за изпитваните химикали, които пораждат безпокойство. Настоящият метод за изпитване не предоставя пълна информация по всички аспекти на репродукцията и развитието на организма. По-конкретно, той предлага единствено ограничени средства за откриване на постнатални прояви на пренатална експозиция, или ефекти, които може да бъдат индуцирани по време на постнатална експозиция. Наред с другите причини, поради избирателността на крайните точки и кратката продължителност на проучването, този метод няма да предостави доказателство за категорични твърдения за липса на ефекти върху репродукцията/развитието. Нещо повече, при отсъствието на данни от други изследвания за токсичност за

репродукцията/развиващия се организъм, положителните резултати са полезни за първоначалната оценка на опасността и допринасят за вземането на решения по отношение на необходимостта и графика за допълнителни изпитвания.

8. Резултатите, получени от свързаните с жлезите с вътрешна секреция параметри, следва да се разглеждат в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (8). В тази Концептуална рамка подобрените TG 422 на ОИСП се съдържат в ниво 4 като изследване *in vivo*, предоставящо данни за неблагоприятните ефекти върху крайните точки, относими към ендокринната система. Все пак, един ендокринен сигнал сам по себе си не може да се разглежда като достатъчно доказателство, че изпитваният химикал е вещество, нарушаващо функциите на ендокринната система.
9. Методът на изпитване набляга и върху неврологичните ефекти като специфична крайна точка, а акцентът е поставен върху необходимостта от внимателни клинични наблюдения на животните с оглед получаване на възможно най-пълна информация. Методът следва да идентифицира химикали с невротоксичен потенциал и може да служи за основание за допълнително задълбочено проучване в тази посока. В допълнение, методът може да предоставя и базови указания за имунологичните ефекти.
10. При отсъствието на данни от други изследвания за системна токсичност, токсичност за репродукцията/развиващия се организъм, невротоксичност и/или имунотоксичност, положителните резултати са полезни за първоначалната оценка на опасността и допринасят за вземането на решения по отношение на необходимостта и графика за допълнителни изпитвания. Изпитването може да е особено полезно като част от Информационния набор от скрининг информация (SIDS) на ОИСП за оценка на съществуващите химикали, за които съществува малко или никаква информация и може да служи като алтернатива на провеждането на две отделни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза (ОИСП TG 407, съответстващи на глава Б.7 от настоящото приложение) и токсичност за репродукцията/развиващия се организъм (ОИСП TG 421, съответстващи на глава Б.63 от настоящото приложение), респективно. Може да се използва и като проучване за определяне на обхвата на дозата за по-обхватни проучвания по отношение на репродукцията/развиващия се организъм или когато се приема за уместно по други причини.
11. Като цяло се смята, че съществуват различия в чувствителността между бременни и небременни животни. Следователно в настоящото комбинирано изпитване може да е по-сложно да се определят нива на дози, които да са адекватни за оценяване както на общата системна токсичност, така и на специфичната токсичност на репродукцията/развиващия се организъм, отколкото когато се провеждат индивидуални изпитвания поотделно. Нещо повече, тълкуването на резултатите от

изпитването по отношение на общата системна токсичност може да бъде по-трудно отколкото когато се провежда отделно проучване с повтаряща се доза, особено когато не се оценяват серумните и хистопатологичните параметри по едно и също време в проучването. Поради тази техническа усложненост, при изпълнение на подобно комбинирано скринингово изпитване се изисква значителен опит в изпитванията за токсичност. От друга страна, освен малкия брой участващи животни, комбинираното изпитване може да предложи по-добри средства за разграничаване на преките ефекти върху репродукцията/развитието от ефектите, които са вторични спрямо други (системни) ефекти.

12. При това изпитване, периодът на дозиране е по-дълъг от този при конвенционалното 28-дневно проучване с повтаряща се доза. В него обаче се използват по-малко животни от всеки пол в група, отколкото в ситуацията, при която в допълнение към скрининговото изпитване за токсичност за репродукцията/развиващия се организъм се провежда конвенционално 28-дневно проучване с повтаряща се доза.
13. Настоящият метод за изпитване предполага орален прием на изпитвания химикал. Ако се използват други пътища на експозиция, може да се наложат изменения на метода.
14. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.
15. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

16. Изпитваният химикал се прилага в нарастващи дози на няколко групи от мъжки и женски индивиди. Мъжките следва да бъдат дозирани в продължение на най-малко четири седмици включително до деня преди планираното им умъртвяване и (това включва минимум две седмици преди чифтосване, по време на периода на чифтосване и приблизително две седмици след чифтосване). Предвид ограничения период на дозиране на мъжките преди чифтосване, плодовитостта може да не бъде особено чувствителен показател за тестикуларна токсичност. Ето защо, детайлно хистологично изследване на тестисите е от съществено значение. Комбинацията от период на дозиране преди чифтосване от две седмици и последващи наблюдения на чифтосването/плодовитостта с цялостния период на дозиране от минимум четири седмици, последван от детайлни хистопатологични изследвания на мъжките полови

жлези, се разглежда като достатъчен, за да могат да бъдат определени голяма част от ефектите върху мъжката плодовитост и сперматогенеза.

17. Женските следва да бъдат дозирани през целия период на проучването. Това включва две седмици преди чифтосване (като целта е да се обхванат най-малко два пълни естрални цикъла), променливото време до зачеване, продължителността на бременността и най-малко тринадесет дни след раждането, включително деня преди планираното им умъртвяване.
18. Продължителността на проучването, след аклиматизацията и оценката на естралния цикъл преди дозиране, зависи от функционирането на женската полова система и е приблизително 63 дни, [най-малко 14 дни преди чифтосването, (до) 14 дни за чифтосване, 22 дни бременност, 13 дни лактация].
19. По време на периода на прилагане, животните се наблюдават внимателно и ежедневно за признаци на токсичност. Животните, които умират или са умъртвени по време на изпитването, се аутопсират, а преживелите животни се умъртвяват и се аутопсират при приключването на изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Избор на животински вид

20. Настоящият метод за изпитване е предназначен за употреба с плъхове. Ако параметрите, определени в рамките на тези TG 422, се изследват при друг вид гризачи, следва да бъде представена детайлна обосновка. Плъховете са единственият биологичен вид, използван в рамките на международната валидационна програма за откриване на вещества, нарушаващи функциите на ендокринната система в TG 407. Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост или породи, за които е характерна висока честота на вродените аномалии. Трябва да се използват здрави, нераждали животни, които не са били подлагани на предишни експериментални процедури. Тестовите животни следва да се характеризират по вид, порода, пол, тегло и възраст. При започване на изследването разликите в теглото на използваните животни следва да бъдат минимални и да не надвишава 20% от средното за всеки пол тегло. Когато изследването се провежда като предварително до дългосрочно проучване или проучване на цяло поколение, за предпочитане е в двете изследвания да се използват животни от една и съща порода и източник.

Условия на отглеждане и хранене

21. Всички процедури трябва да са в съответствие с местните стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C ($\pm$ 3 °C). Относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за

предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по настоящия метод.

22. Животните се настаняват групово, в малки групи от един и същи пол; животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано. При групово настаняване в клетки не следва да има повече от пет животни в клетка. Чифтосването трябва да се извърши в клетки, подходящи за тази цел. Бременните женски следва да бъдат настанявани поотделно и да им бъдат предоставяни материали за изграждане на гнездо. Кърмещите женски се настаняват поотделно заедно с потомството си.
23. Храната следва да бъде редовно анализирана за наличието на замърсители. Проба от хранителния режим трябва да се съхранява до окончателното изготвяне на доклада.

Подготовка на опитните животни

24. Здрави, млади, полово зрели животни се определят на произволен принцип за контролните и опитните групи. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Животните се идентифицират по уникален начин и се настаняват в клетките им най-малко пет дни преди началото на проучването, за да им се осигури време за аклиматизиране към лабораторните условия.

Приготвяне на дозите

25. Препоръчително е изпитваният химикал да се прилага орално, освен ако други пътища на приложение не бъдат определени като по-подходящи. При избор на оралния път, изпитваният химикал обикновено се прилага с помощта на сонда; въпреки това, друга възможност за приложение на изпитваните химикали е също чрез хранителната диета или питейната вода.
26. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това да се прецени за разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — за разтваряне в други носители. При работа с не-водни носители, трябва да бъдат известни токсичните характеристики на съответния носител. Трябва да се определят стабилността и хомогенността на изпитвания химикал в носителя.

ПРОЦЕДУРА

Брой и пол на животните

27. Препоръчително е в началото всяка група да е с най-малко 10 мъжки и 12-13 женски индивида. Женските се оценяват преди експозицията за естрална цикличност и животните, които не проявят типичните 4-5-дневни цикли, не се включват в проучването; това е причината за препоръчителния допълнителен брой женски, с цел да се отделят по 10 женски в група. Освен в случай на ясно изразени токсични ефекти, в резултат от това се очаква да има най-малко 8 бременни женски в група, което обикновено е минималният приемлив брой бременни женски на група. Целта е да се осигурят достатъчно бременности и потомство, за да се гарантира значима оценка на потенциала на изпитвания химикал да оказва влияние върху плодовитостта, бременността, поведението на майката и това на малките при кърмене, растежа и развитието на поколение F₁ от зачеването до ден 13 след раждането. Ако междувременно се планира убиване на животни преди завършването на изследването, броят се увеличава в зависимост от броя на животните, които е планирано да бъдат убити. Следва да бъде разгледана възможността за допълнителна сателитна група от по пет животни от всеки пол в контролната група и в групата, третирана с най-високата доза за наблюдение на обратимостта, устойчивостта или забавеното възникване на системните токсични ефекти, в продължение на най-малко 14 дни след третиране. Животните от сателитните групи няма да бъдат чифтосвани и следователно, не се използват за оценяване на токсичност за репродукцията/развитието.

Дозиране

28. Обикновено се използват поне три опитни групи и една контролна. Ако няма налични подходящи данни за общата токсичност, може да се проведе проучване за определяне на диапазона на дозата (с животни от същата порода и източник за набавяне), което да помогне при определянето на дозите, които да бъдат използвани. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано количество носител.
29. Нивата на дозиране следва да бъдат подбрани така, че да се отчитат всички съществуващи и налични данни за токсичност и (токсико-) кинетика. Следва да се вземе предвид и фактът, че може да съществуват различия в чувствителността на бременни и небременни животни. Целта при избор на най-високото ниво на доза е индуциране на токсични ефекти, но не смърт или явно страдание. След това следва да се избере последователност с намаляващи нива на дозиране с цел демонстриране на всеки отклик, свързан с дозирането и достигане на най-ниското ниво на дозиране без неблагоприятни ефекти. В повечето случаи е най-подходящо всяка доза да намалява два до четири пъти спрямо най-близката по-висока доза, а добавянето на

допълнителна четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти).

30. При наличие на наблюдения за обща токсичност (напр. намалено телесно тегло, въздействие върху черния дроб, сърцето, белите дробове или бъбреците и др.) или други промени, които може да не бъдат токсични реакции (напр. намален прием на храна, уголемяване на черния дроб), наблюдаваните ефекти върху ендокринни чувствителни крайни точки следва да се тълкуват предпазливо.

Гранично изпитване

31. Ако изследване с орално третиране с ниво на еднократна доза от най-малко 1000 mg/kg телесно тегло/ден или при приложение с храната с доза, която е еквивалентен процент, в храната или питейната вода (на базата на определеното телесно тегло), като се използват процедурите, описани в настоящото изследване, не доведе до забележими токсични ефекти и, ако въз основа на данните от структурно свързани вещества не се очаква токсичност, тогава може да не се смята за необходимо провеждането на пълно изследване с използване на няколко нива на дозиране. Изпитването при пределна концентрация се прилага, с изключение на случаи, при които експозиция на хора подсказва нуждата от използване на по-високо ниво на доза. За другите видове приложения, като например инхалация или дермално приложение, физикохимичните свойства на изпитваните химикали често налагат използване на максимално постижимата експозиция.

Прилагане на дозите

32. Животните се дозират с изпитвания химикал в продължение на 7 дни в седмицата. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, това следва да става чрез еднократна доза за животното през стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът не следва да превишава 1 ml/100 g т.м., освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори. Тогава обемът може да достигне 2 ml/100 g т.м. С изключени на дразнещите или корозивни изпитвани химикали, които обикновено водят до засилени ефекти при по-високи концентрации, промените в изпитвания обем следва да бъдат сведени до минимум чрез коригиране на концентрацията, за да се гарантира постоянен обем при всички нива на дозиране.
33. За изпитвани химикали, прилагани с храната или питейната вода, е важно да се гарантира, че количествата на приложения изпитван химикал не пречат на нормалния хранителен или воден баланс. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим, могат да бъдат използвани постоянна хранителна концентрация (ppm) или постоянно ниво на доза спрямо телесното тегло на

животното; използваната алтернатива следва да бъде описана. За изпитван химикал, прилаган с помощта на сонда, дозата следва да бъде прилагана в сходни моменти всеки ден, и коригирана най-малко веднъж седмично, за да се поддържа постоянно ниво на дозиране, предвид телесното тегло на животното. Когато комбинирано проучване се използва като предварително за дългосрочно или пълно проучване за токсичност на репродукцията, при двете проучвания следва да се използва сходна хранителна диета.

Експериментален график

34. Дозирането на двата пола следва да започне 2 седмици преди чифтосване, след като животните са аклиматизирани в продължение на най-малко пет дни и женските са били проверени за нормален естрален цикъл (в рамките на 2-седмичния период преди третирането). Изследването следва да бъде планирано по такъв начин, че оценката на естралния цикъл да започне скоро след като животните навършат пълна полова зрялост. Това може леко да варира за различните породи плъхове в различни лаборатории, напр. плъхове Sprague Dawley - 10-седмична възраст, плъхове Wistar - около 12-седмична възраст. Майките и потомството следва да бъдат умъртвени на ден 13 след раждането, или скоро след това. За да се гарантира, че самките няма да приемат храна за през нощта преди вземането на кръв (ако тази опция е предпочитана), не е задължително самките и тяхното потомство да бъдат умъртвявани в един и същи ден. Денят на раждането (тоест, когато раждането завърши) се определя като ден 0 след раждането. Женските, които не показват признаци за копулация се умъртвяват 24-26 дни след последния ден от периода за чифтосване. Дозирането продължава за двата пола по време на периода за чифтосване. Мъжките следва да бъдат допълнително дозирани след периода за чифтосване, най-малкото докато завърши минималния общ период за дозиране от 28 дни. След това се умъртвяват или друга възможност е да се запазят и да продължат да бъдат дозирани за евентуално провеждане на второ чифтосване, ако това се сметне за уместно.
35. Ежедневното дозиране на женските майки следва да продължи през цялата бременност и най-малко до ден 13 след раждането включително, или до деня преди умъртвяването им. При проучвания, в които изпитваният химикал се прилага чрез инхалация или по кожен път, дозирането следва да бъде продължено най-малко до ден 19 от бременността включително, като то следва да бъде възобновено възможно най-скоро и не по-късно от постнатален ден (PND) 4.
36. Животните в сателитните групи, планирани за контролни наблюдения, ако са включени, не се чифтосват. Те следва да бъдат задържани за поне още 14 дни след първото планирано умъртвяване на самките, без третиране, за да се открие

забавеното възникване или устойчивост на токсичните ефекти, или възстановяване от тях.

37. Схема на експерименталния график е дадена в допълнение 2.

Естрални цикли

38. Естралните цикли следва да бъдат наблюдавани преди да започне третирането, за да се подберат за изследването женски с редовна цикличност (вж. точка 27). Вагиналните натривки следва също да се наблюдават ежедневно от началото на периода на третиране до потвърждение за чифтосване. Ако има притеснения за ефекти на остър стрес, които биха могли да променят естралните цикли с началото на дозирането, лабораториите могат да изложат тестовите животни за 2 седмици, след което да вземат вагинални натривки ежедневно и да следят естралния цикъл в продължение на минимум две седмици по време на периода преди чифтосване, като наблюдението да продължи и през периода на чифтосване, докато бъде открито потвърждение за чифтосване. Вземането на клетки от влагалището/цервикса следва да бъде внимателно, за да се избегне увреждане на лигавицата, което може индуцира псевдобременност (8) (9).

Процедура на чифтосването

39. В настоящото изследване обикновено следва да се използва чифтосване 1:1 (един мъжки с една женска). Изключения могат да възникнат в случай на непредвидена смърт на мъжките. Женските индивиди следва да бъдат поставени заедно с мъжкия, докато не бъде забелязано доказателство за копулация или до изтичането на две седмици. Всяка сутрин женските следва да бъдат преглеждани за наличие на сперма или вагинална запушалка. Ден 0 от бременността се определя като деня, в който е потвърдено доказателството за чифтосване (откриване на вагинална запушалка или сперма). Когато чифтосването е било неуспешно, може да се извърши повторно чифтосване на женските животни с мъжки животни с доказан фертилитет от същата опитна група.

Брой на животните в котилото

40. На ден 4 след раждането, броят на животните във всяко котило може да се коригира, като се елиминират излишните новородени чрез произволна селекция, за да се постигне, доколкото е възможно, по четири или пет новородени от един пол в котило, в зависимост от нормалния брой на животните в котилото за използваната порода плъхове. От две от излишните новородени следва да бъдат взети кръвни проби, които да бъдат, обединени и използвани за определяне на серумните нива на Т4. Селективно елиминиране на новородени, напр. въз основа на телесното тегло, или разстоянието между ануса и половите органи (РАПО) не е уместно. Когато броят на мъжките или женските новородени не позволява отделяне по четири или пет от

един пол във всяко котило, е приемливо частично коригиране (например, шест мъжки и четири женски). Не се елиминират новородени, когато броят на животните в котилото падне под целта за бракуване (8 или 10 новородени/котило). Ако има само едно новородено над целта за бракуване, само едно новородено ще бъде бракувано и използвано за вземане на кръв за евентуални оценки на серумните нива на Т4.

41. Ако броят на животните в котилото не се коригира, на ден 4 след раждането се умъртвяват две новородени на котило и се вземат кръвни проби за измерване на серумните концентрации на тироидния хормон. Ако е възможно, двете новородени на котило следва да бъдат женски, с цел да се резервират мъжки новородени за оценка на запазването на зърната на млечните жлези, с изключение на случая, когато при премахването на тези новородени не остават женски за оценяване при прекратяване на изпитването. Когато броят на животните в котилото падне под 8 или 10 новородени/котило (в зависимост от нормалния брой на животните в котилото при използваната порода плъхове), не се елиминират новородени. Ако има само едно новородено над нормалния брой на животните в котилото, само едно новородено ще бъде елиминирано и използвано за вземане на кръв за евентуални оценки на серумните нива на Т4.

Наблюдения

42. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно, за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Здравословното състояние на животните следва да се записва. Поне два пъти дневно всички животни се наблюдават за заболяемост и смъртност.
43. Веднъж преди първата експозиция (с цел да са възможни сравнения в рамките на изпитвания обект) и най-малко веднъж седмично след това следва да бъдат правени детайлни клинични наблюдения на всички родители от животните. Тези наблюдения следва да се правят извън клетката, в която живеят, на стандартно място и за предпочитане по едно и също време на деня. Наблюденията следва да бъдат внимателно записвани; за предпочитане, като се използват системи за оценяване, изрично определени от изпитващата лаборатория. Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията в условията на изпитването са минимални, както и че наблюденията се извършват за предпочитане от хора, неинформирани за изпитването. Отбелязваните признаци следва да включват промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секреция и екскреция, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане), без да се ограничават до това. Следва да се записван и промени в походката, стойката и реакцията при манипулиране, както и наличието на

клонични или тонични движения, стереотипи (напр. прекомерно близане на козината, повтарящо се движение в кръг), затруднено или продължително раждане или странно поведение (напр. само-осакатяване, вървене назад) (10).

44. В даден момент по време на проучването следва да се извърши оценка на сензорната реактивност на стимули от различно естество (напр. слухови, визуални и проприоцептивни стимули) (8) (9) (11), оценка на силата на захват(12) и оценка на моторната активност (13) на пет мъжки и пет женски животни, произволно избрани от всяка група. Допълнителни уточнения по процедурите, които могат да бъдат следвани, са дадени в съответните препратки. Въпреки всичко могат да се използват и алтернативни процедури, различни от тези, към които се препраща. При мъжките, тези функционални наблюдения следва да се правят към края на техния период на дозиране, малко преди планираното им умъртвяване, но преди вземането на кръв за хематологични или клинично-химични изследвания (вж. точки 53-56, включително бележката под линия 1). Женските следва да бъдат в сходно физиологично състояние по време на тези функционални изпитвания и за предпочитане е да бъдат изпитани веднъж по време на последната седмица кърмене (напр., LD 6-13), малко преди планираното им умъртвяване. Доколкото е възможно, времето за разделяне на самките от новородените трябва да се сведе до минимум.
45. Функционалните наблюдения, извършени веднъж към края на проучването, може да бъдат пропуснати, когато проучването се провежда като предварително проучване към последващо субхронично (90-дневно) или дългосрочно проучване. В този случай функционалните наблюдения следва да бъдат включени в това последващо изследване. От друга страна, наличието на данни от функционалните наблюдения от проучването с повтаряща се доза може да подобри способността за избор на нива на дозата за последващото субхронично или дългосрочно проучване.
46. По изключение, функционалните наблюдения могат също да се избегнат за групи, които иначе показват признаци на токсичност в размер, който значително би попречил на извършването на функционалното изпитване.
47. Продължителността на бременността следва да бъде записвана и изчислявана от ден 0 от бременността. Всяко котило следва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането, за да се установи броят и полът на новородените, броят на мъртвородените, живородените, изтърсаците (новородени, които са значително по-малки от съответните контролни новородени) и наличието на макроскопски аномалии.
48. Живите новородени следва да се преброят и да се определи полът им, а котилата да се претеглят в рамките на 24 часа след раждането (ден 0 или 1 след раждане) и поне на ден 4 и ден 13 след раждането. В допълнение към наблюденията на животните

родители (вж. точки 43 и 44) следва да се запише всяко аномално поведение на потомството.

49. РАПО разстоянието следва да се измери на същия ден след раждането между PND 0 до PND 4. Телесното тегло на новороденото следва да бъде измерено в деня на измерване на РАПО, и стойността на РАПО следва да бъде нормализирана към размера на новороденото, за предпочитане към кубичния корен от телесното тегло (14). Броят на зърната/ареолите на гърдите на мъжките новородени следва да се преброи на PND 12 или 13, както се препоръчва в GD 151 на ОИСП (15).

Телесно тегло и консумация на храна/вода

50. Мъжките и женските следва да се претеглят на първия ден от дозирането, и минимум всяка седмица след това, както и при прекратяване на изследването. По време на бременност, женските следва да се претеглят на дни 0, 7, 14 и 20, и в рамките на 24 часа след раждането (ден 0 или 1 след раждането) и минимум на ден 4 и ден 13 след раждането. Тези наблюдения трябва да се описват индивидуално за всяко половозряло животно.
51. По време на периода преди чифтосването, бременността и кърменето, консумацията на храна следва да се измерва най-малко веднъж седмично. Измерването на консумацията на храна по време на чифтосване е незадължително. Консумацията на вода по време на тези периоди също следва да се измерва, когато изпитваният химикал се прилага с тази среда.

Хематология

52. Веднъж по време на проучването следва да се правят следните хематоложки изследвания на пет мъжки и пет женски животни, избрани на произволен принцип от всяка група: хематокрит, концентрации на хемоглобин, брой на еритроцитите, ретикулоцити, общ и диференциален брой на левкоцити, брой на тромбоцитите, както и измерване на времето на съсирване/потенциала за съсирване на кръвта. Други определяния, които следва да се извършат, ако изпитваният химикал или неговите предполагаеми метаболити имат, или се предполага че имат, окислителни свойства, включват концентрация на метхемоглобин и телца на Heinz.
53. Кръвните проби следва да бъдат вземани от предварително определено място. Женските следва да бъдат в сходно физиологично състояние по време на вземането на проби. За да се избегнат практически трудности, свързани с различното начало на бременността, вземането на кръв от женските може да се прави в края на периода преди чифтосване като алтернатива на вземането на кръв непосредствено преди процедурата за евтаназия на животните или като част от нея. За предпочитане е кръвните проби от мъжките да се вземат непосредствено преди процедурата за евтаназия на животните или като част от нея. Като алтернатива, вземането на кръв от

мъжките може да се прави и в края на периода преди чифтосване, когато този момент е бил предпочетен и за женските.

54. Кръвните проби следва да се съхраняват при подходящи условия.

Клинична биохимия

55. Клинични биохимични изследвания за проучване на основните токсични ефекти върху тъканите и по-специално, ефектите върху бъбреците и черния дроб, следва да се извършват върху кръвни проби, получени от подбрани пет мъжки и пет женски животни от всяка група. Препоръчва се една нощ гладуване на животните преди вземане на кръвни проби¹. Изследванията на плазма или серум следва да включват натрий, калий, глюкоза, общ холестерол, урея, креатинин, общ протеин и албумин, най-малко два ензима, показателни за хепатоцелуларни ефекти (като аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза и сорбитол дехидрогеназа) и жлъчни киселини. Измерванията за допълнителни ензими (от чернодробен и друг произход) и билирубин могат да дадат полезна информация при определени обстоятелства.

56. От определено място се вземат кръвни проби на базата на следния график:

- от поне две новородени на котило, на ден 4 след раждането, ако броят на новородените го позволява (вж. точки 40-41)
- от всички майки и поне от две новородени на котило при прекратяването на ден 13, и
- от всички зрели мъжки, при прекратяването

Всички кръвни проби се съхраняват при подходящи условия. Кръвните проби от новородените на ден 13 и от зрелите мъжки се оценяват за серумни нива на тироидните хормони (T4). Ако е уместно се прави допълнителна оценка на T4 в

¹ За редица измервания на серума и плазмата, и най-вече за глюкозата, се предпочита гладуване през нощта преди измерването. Основната причина за това предпочитание е, че нарасналото вариране, което неминуемо би последвало ако не се прилага гладуване, би могло да замаскира по-трудно доловими ефекти и да затрудни интерпретирането. От друга страна обаче, гладуването през нощта може да попречи на общия метаболизъм на (бременните) животните, нарушава поведението на лактация и кърмене и особено в проучванията с хранене, може да наруши ежедневната експозиция на изпитвания химикал. Ако бъде възприето гладуване през нощта, клиничните биохимични изследвания следва да бъдат извършени след провеждането на функционалните наблюдения през 4-тата седмица от проучването на мъжките животни. Самките следва да бъдат запазени за още един допълнителен ден, след като са премахнати новородените, напр. на ден 13 PND). Самките следва да бъдат оставени гладни през нощта на 13-я срещу 14-я ден от лактацията, и кръвта, взета при прекратяване на проучването, да се използва за определяне на клиничните химични параметри.

кръвните проби от самките и новородените на ден 4. Също ако е уместно, може да се извърши незадължително измерване на други хормони. Кръвта на новородените може да се обедини по котила за анализите на тироидния хормон. За предпочитане е тироидните хормони (T4 и TSH) да се измерват като „общи“.

57. По избор, през последната седмица от проучването могат да се проведат следните изследвания на урината от пет мъжки от всяка група, избрани на произволен принцип, като се използва събиране на урината по часове; външен вид, количество, осмолалитет и относително тегло, рН, протеини, глюкоза и кръв/кръвни клетки.
58. Като допълнение следва да се предвидят изследвания на серумни маркери за основните увреждания на тъканите. Други изследвания, които трябва да се проведат, ако известните свойства на изпитвания химикал може или има подозрения, че засягат свързаните метаболитни профили, включват калций, фосфат, триглицериди и глюкоза на гладно, специфични хормони, метхемоглобин и холинестераза. Те трябва да бъдат идентифицирани за всеки отделен случай.
59. Следните фактори могат да повлияят на варирането и на абсолютните концентрации при определянето на хормони:
- времето на умъртвяване, поради дневните колебания в концентрацията на хормони
 - методът на умъртвяване, за да се избегне ненужен стрес за животните, който може да повлияе на концентрациите на хормони
 - комплектите за изпитване за определяне на хормони, които могат да се различават по стандартните си криви.
60. Пробите от плазма, специално предназначени за определяне на хормони, следва да бъдат получени в сравними периоди през деня. Числовите стойности, получени при анализа на концентрации на хормони, се различават при употребата на различни търговски комплекти за анализ.
61. Ако базовите данни за минали периоди са недостатъчни, следва да се разгледа възможност за определяне на хематологичните и клиничните биохимични променливи преди началото на дозирането или за предпочитане в набор от животни, които не са включени в опитните групи. За женските данните трябва да бъдат от кърмещи животни.

ПАТОЛОГИЯ

Макроскопска аутопсия

62. Всички възрастни животни, подложени на изследване, са обект на цялостна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателно изследване на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната

кухини и тяхното съдържание. Особено внимание при огледа трябва да се обърне на органите на половата система. Броят на местата за имплантация следва да бъде записан. Вагиналните натривки следва да бъдат изследвани в деня на аутопсията, за да се определи стадият на естралния цикъл и да се даде възможност за корелация с хистопатологичното изследване на женските репродуктивни органи.

63. Тестисите и епидидимите, както и простатата и семенните мехурчета с коагулиращите жлези като цяло трябва да бъдат изрязани от всички мъжки зрели животни и почистени от прилежащите тъкани, според необходимостта, и трябва да се претеглят в мокро състояние възможно най-скоро след дисекцията, за да не се допусне изсъхването им. В допълнение, опционалното тегло на органите може да включва мускула повдигач на ануса плюс булбокавернозния мускулен комплекс, жлезите на Каупър и главичката на пениса при мъжките и двойката яйчници (мокро тегло) и матката (включително маточната шийка) при женските; ако са включени, тези тегла следва да бъдат взети възможно най-скоро след дисекцията. Яйчниците, тестисите, епидидимите, допълнителните полови органи и всички органи, показващи макроскопски лезии при всички възрастни животни следва да бъдат запазени.
64. От всички възрастни мъжки и женски и от едно мъжко и едно женско новородено на 13 дни от всяко котило следва да се запазят щитовидните жлези в най-подходящата среда за фиксиране за предвиденото последващо хистопатологично изследване. Теглото на щитовидната жлеза може да се установи след фиксиране. Почистването също следва да се осъществи много внимателно и само след фиксиране, за да се избегне увреждане на тъканите. Увреждането на тъканите може да постави под съмнение хистопатологичния анализ. Кръвните проби следва да се вземат от определено място, точно преди или като част от процедурата за евтаназия на животните и да се съхраняват при подходящи условия (вж. точка 56).
65. В допълнение, от най-малко пет възрастни мъжки и женски, произволно избрани от всяка група (освен онези, които са намерени агонизиращи и/или са евтаназирани преди прекратяване на изследването), следва да се изрежат черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, тимусът, далакът, мозъкът и сърцето от всички прилежащи тъкани, според необходимостта, и да се претеглят в мокро състояние възможно най-скоро след дисекцията, за да не се допусне изсъхването им. Следните тъкани следва да бъдат запазени в най-подходящата среда за фиксиране, както за типа тъкан, така и за предвиденото последващо хистопатологично изследване: всички макроскопски лезии, мозъкът (представителни области, включително главният мозък, малкият мозък и моста), гръбначният мозък, очите, стомахът, тънките и дебелите черва (включително Пайеровите плаки), черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, далакът, сърцето, тимусът, трахеята и белите дробове (запазени чрез инфлация с фиксатор, след което потопени), половите жлези (тестиси и яйчници), допълнителните полови органи (матка и маточна шийка, епидидими, простата,

семенни мехурчета плюс коагулиращи жлези), вагина, пикочен мехур, лимфни възли (освен разположеният най-близо до средата на тялото дрениращ възел следва да бъде взет и друг лимфен възел, в съответствие с опита на лабораторията (16)), периферен нерв (седалищен или тибиален) за предпочитане в непосредствена близост до мускула, скелетен мускул и кост с костен мозък (срез от костен мозък или, като алтернатива, прясно фиксиран костномозъчен аспират). Препоръчва се тестисите да бъдат фиксирани чрез потапяне във фиксатор на Буен или модифициран фиксатор на Дейвидсън (16) (17) (18); фиксиране във формалин не се препоръчва за тези тъкани. Бялото покривало (*tunica albuginea*) може внимателно да се пробие на неголяма дълбочина в двата края на органа с помощта на игла, за да се позволи бързо проникване на фиксатора. Клиничните и другите сведения могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Също така всички органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, също следва да бъдат консервирани.

66. Следните тъкани могат да предоставят ценни показания за свързани с ендокринната система последици: полови жлези (яйчници и тестиси), допълнителни полови органи (матка, включително маточна шийка, епидидими, семенни мехурчета плюс коагулиращи жлези, простата, локализирана дорзолатерално и вентрално), влагалището, хипофиза, мъжка млечна жлеза и надбъбречна жлеза. Промените в мъжките млечни жлези не са достатъчно добре документирани, но този параметър може да бъде особено чувствителен към вещества с естрогенно действие. Наблюдението на органи/тъкани, които не са изброени в точка 65, е по избор.
67. Мъртвите новородени и новородените, умъртвени на ден 13 след раждането или скоро след това, трябва най-малко да бъдат внимателно огледани външно за макроскопски аномалии. Особено внимание следва да се обърне външните репродуктивни полови органи, които да се огледат за признаци на променено развитие.

Хистопатология

68. На запазените органи и тъкани от избраните животни от контролната група и от групите с най-висока доза (като специално се наблегне върху стадите на сперматогенеза в мъжките полови жлези и хистопатологично изследване на интерстициалната тестикуларна клетъчна структура) следва да се направят пълни хистопатологични изследвания. Щитовидни жлези от новородени и от останалите възрастни животни може да бъдат изследвани, когато е необходимо. Тези изследвания следва да обхванат и животните от групи с други нива на дозата, ако бъдат забелязани промени в групата, третирана с най-висока доза. В Указанията за хистопатология (10) се съдържа допълнителна подробна информация относно дисекцията, фиксирането, разрязването и хистопатологията на ендокринните тъкани.

69. Изследват се всички общи наранявания. Прицелните органи от групи, третирани с други дози, особено от групи, за които се твърди, че показват NOAEL, следва да бъдат изследвани, за да се установят нивата на NOAEL.
70. Когато се използва сателитна група, хистопатология следва да се извършва на тъкани и органи, за които е установено, че показват ефект при третираните групи.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

71. Следва да бъдат осигурени индивидуални данни за всяко животно. Допълнително, всички данни следва да бъдат обобщени в таблична форма, като за всяка изпитвана група се посочва броят на животните в началото на изпитването, броят на животните, открити мъртви по време на изпитването или евтаназирани, времето на смъртта или евтаназията, броят на плодовитите животни, броят на бременните женски, броят на животните, показващи признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на началото, продължителността и сериозността на всички токсични ефекти, видовете хистопатологични изменения и всички относими данни за котилото. Табличен формат на обобщено протоколиране, който се е доказал като особено полезен за оценката на ефектите върху репродукцията /развитието, е даден в допълнение 3.
72. Когато е възможно, цифровите резултати следва да бъдат оценени с помощта на подходящ и общоприет статистически метод. Чрез сравнения на въздействието в рамките на даден обхват на дозиране следва да се избегне използването на множество t-изпитвания. Статистическите методи следва да бъдат избрани при планирането на изследването. Статистическият анализ на РЕПО и запазването на зърната на млечните жлези трябва да бъде базиран на индивидуални данни за новороденото, като взема под внимание ефектите на котилото. Където е уместно, котилото е единицата за анализ. Статистическият анализ на телесното тегло на новороденото трябва да бъде базиран на индивидуални данни за новороденото, като взема под внимание броя на животните в котилото. Поради ограничените размери на изследването, статистически анализи във формата на изпитвания за „значимост“ са с ограничена стойност за много крайни точки, и особено за крайните точки на репродукцията. Някои от най-широко използваните методи, особено параметричните изпитвания за измерване на централна тенденция, са неподходящи. Ако се използват статистически анализи, тогава избраният метод следва да бъде подходящ за разпределението на изследваната променлива и да бъде избран преди началото на изследването.

Оценка на резултатите

73. Констатациите на това изследване за токсичност следва да бъдат оценени, като се вземат предвид наблюдаваните ефекти, аутопсията и микроскопските находки. Оценката включва връзката между дозата на изпитвания химикал и наличието или отсъствието, разпространението и сериозността на аномалиите, включително макроскопски лезии, идентифицирани прицелни органи, безплодие, клинични аномалии, засегната ефективност на репродукцията и на котилото, промени в телесното тегло, ефекти върху смъртността и всякакви други токсични ефекти.
74. Поради краткия период на третиране на мъжките индивиди, хистопатологичното изследване на тестисите и епидидимите следва да се разглежда заедно с данните за плодовитост, когато се оценяват ефектите върху мъжката репродуктивна система. Използването на контролни данни от предходни периоди за репродукцията/развитието на организма (напр. относно броя на животните в котилото, РЕПО, запазване на зърната на млечните жлези, серумни нива на Т4), когато са налични, могат също да бъдат полезни като спомагателно средство за интерпретиране на изследването.
75. За контрол на качеството се предлага да се събират контролни данни за минали периоди и да се изчисляват коефициенти на вариация за числовите данни, особено за параметрите, свързани с откриване на нарушители на функциите на ендокринната система. Тези данни могат да бъдат използвани за сравнение когато се извършва оценка на актуалните изследвания.

Протокол от изпитването

76. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава
- стабилност на изпитвания химикал, ако е известна.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Носител (когато се използва такъв):

- обосновка за избора на носител, когато е различен от вода.

Изпитвани животни:

- използван вид/порода,
- брой, възраст и пол на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.
- обосновка при използване на видове, различни от плъх.

Условия на изпитването:

- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробна информация за това в какъв вид е изпитваният химикал/хранителната смес, постигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно тегло дневно), ако е приложимо,
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробно описание на процедурата за рандомизация при подбора на новородени за бракуване, ако се прилага бракуване.

Резултати:

- телесно тегло/промени в телесното тегло;
- консумация на храна и консумация на вода, ако е приложимо;
- данни за токсичната реакция по пол и доза, включително относно плодовитостта и бременността, както и всякакви други признаци на
- токсичност;
- продължителност на бременността;
- токсични или други ефекти върху репродукцията, потомството, постнаталния растеж и др.;
- природа, сила и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими),
- оценки на сензорната активност, силата на захвата и двигателната активност,

- хематологични изпитвания с относими базови стойности,
- клинични биохимични изпитвания с относими базови стойности,
- брой на възрастните женски с нормален или аномален естрален цикъл и продължителност на цикъла;
- брой на живородените и постимплантационни загуби;
- брой на новородените с макроскопски видими аномалии; макроскопска оценка на външните полови органи, брой на изтърсаците;
- време на смъртта в процеса на изпитването или дали животните са преживели до края на изпитването;
- брой на имплантациите, брой на животните в котилото и тегло на котилото към момента на записване;
- данни за телесното тегло на новороденото
- РЕПО на всички новородени (и телесно тегло в деня на измерване на РЕПО)
- запазване на зърната на млечните жлези при мъжките новородени,
- нива на тиродния хормон, новородени на ден 13 и възрастни мъжки (и самки и новородени на ден 4, ако
- е измерван)
- телесно тегло в момента на умъртвяване и данни за тегло на органи за животните родители;
- находки при аутопсията;
- подробно описание на хистопатологичните находки;
- данни за абсорбция (ако има);
- статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

Тълкуване на резултатите

77. Проучването предоставя оценки на токсичността за репродукцията/развиващия се организъм, свързана с приложението на повторени дози. По-конкретно, тъй като акцентът е поставен както върху общата токсичност, така и върху крайните точки за токсичност за репродукцията/развиващия се организъм, резултатите от изследването позволяват разграничаване на ефектите върху репродукцията/развиващия се организъм, възникващи при липса на обща токсичност, и онези, които се изразяват

само на нива, които са токсични и за животните родители (вж. точки 7-11). То може да представи указание за необходимостта от провеждане на допълнителни изследвания и да предоставя насоки за планиране на следващи изпитвания. Неодходима е консултация с Ръководството на ОИСП 43 за помощ при тълкуването на резултатите, свързани с репродукцията и развитието на организма (19). Ръководство 106 на ОИСП относно „Хистологичната оценка на ендокринните и репродуктивните изпитвания на гризачи“ (16) предоставя информация относно подготовката и оценката на (ендокринните) органи и вагиналните натривки, които могат да бъдат полезни за настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ (ВЖ. И (20) ОИСП GD 150)

Андрогенност е способността на даден химикал да действа като естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организма на бозайник.

Антиандрогенност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организма на бозайник.

Антиестрогенност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен естрогенен хормон (напр. естрадиол 17β) в организма на бозайник.

Антитиреоидна активност е способността на даден химикал да потиска действието на естествен тиреоиден хормон (напр. Т₃) в организма на бозайник.

Химикал означава вещество или смес.

Токсичност за развиващия се организъм: проявата на репродуктивна токсичност, представляваща пред-, пери- или постнатални, структурни или функционални разстройства в потомството.

Доза е количеството приложен изпитван химикал. Дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно), или като постоянна концентрация в храната.

Дозировка е общ термин, обхващащ дозата, нейната честота и продължителност на дозиране.

Очевидна токсичност е общ термин, описващ ясните признаци на токсичност след прилагане на изпитвания химикал. Те следва да бъдат достатъчни за оценка на опасността и следва да бъдат такива, че при увеличаване на прилаганата доза да се очаква развитие на признаци на силна токсичност и вероятна смърт.

Увреждане на плодовитостта представлява разстройства на мъжките или женските възпроизводителни функции или способности.

Токсичност при майката: неблагоприятни ефекти върху бременните женски, възникващи или специфично (пряк ефект), или неспецифично (непряк ефект) и свързани със състоянието на бременност.

NOAEL е съкращение за нивото, при което не се наблюдават неблагоприятни ефекти. Това е най-високото ниво на доза, при което не се наблюдават свързани с третирането неблагоприятни находки в резултат от третирането.

Естрогенност е способността на даден химикал да действа като естествен естрогенен хормон (напр. естрадиол 17β) в организма на бозайник.

Репродуктивна токсичност представлява вредни ефекти върху потомството и/или увреждане на мъжките и женските възпроизводителни функции или способности.

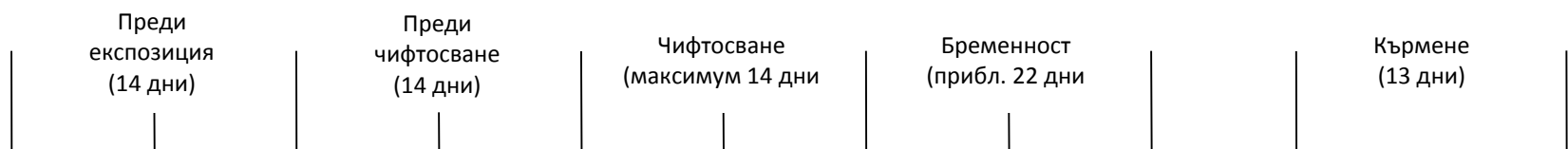
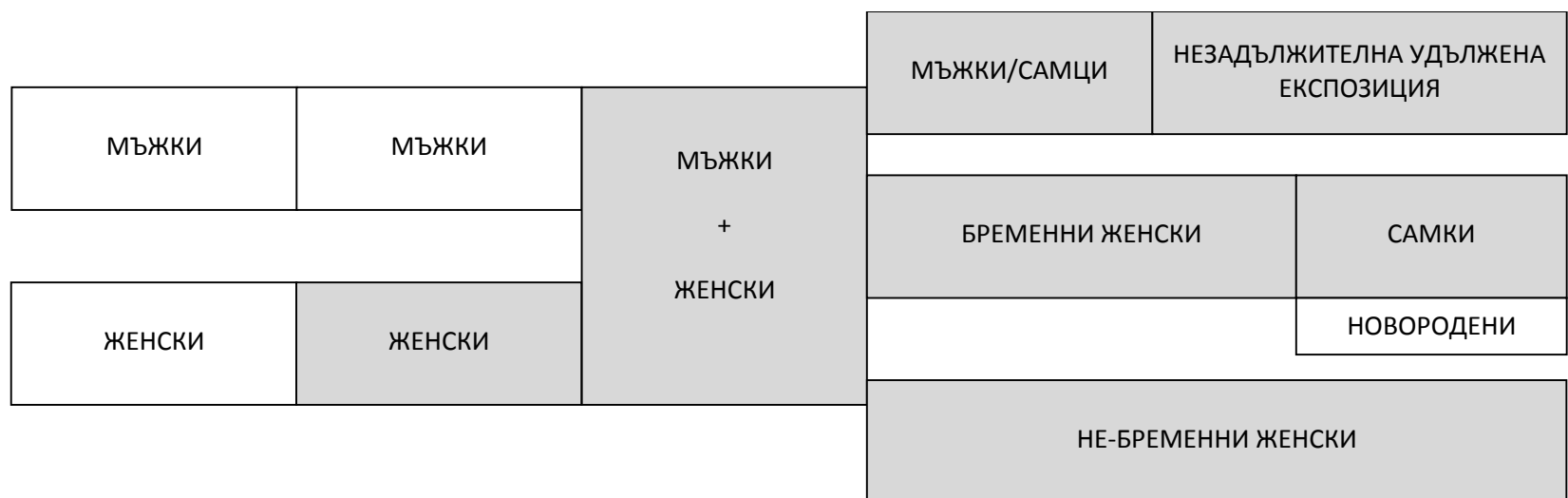
Изпитван химикал е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Тиреоидна активност е способността на даден химикал да действа като естествен тиреоиден хормон (напр. T_3) в организма на бозайник.

Валидиране е научна процедура, предназначена за характеризиране на оперативните изисквания и ограничения на даден метод за изпитване и за доказване на неговата надеждност и относимост за определена цел.

Допълнение 2

**СХЕМА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИЯ ГРАФИК, УКАЗВАЩА МАКСИМАЛНАТА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО, НА
БАЗАТА НА ПЪЛЕН 14-ДНЕВЕН ПЕРИОД НА ЧИФТОСВАНЕ**



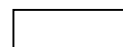
Начало на проучването

Оценка на естралната цикличност преди експозиция, последвана от ежедневно наблюдение на влагалищните натривки от началото на третирането до наличието на доказателство за чифтосване

С дозиране



Без дозиране



Хематологични/клинични химични изследвания на мъжки и женски (незадължително)

Аутопсия на мъжки/самци
Функционални наблюдения на мъжки (незадължително)
Хематологични/клинични химични изследвания на мъжки, при умъртвяване (след период на дозиране от най-малко 4 седмици)

Раждане (PND 0) до PND 4:
РЕПО на всички новородени (PND 0-PND 4; същия ден)
Терминирание на 2 новородени на котило за T4 (PND 4)

Ден 13 след раждането
Аутопсия на женски и новородени
Аутопсия на мъжки/самци (незадължително).
Функционални наблюдения на мъжки (незадължително) и женски
Хематологични/клинични химични изследвания на мъжки и женски (незадължително)
Запазване на зърната на гърдите при мъжките новородени.

Допълнение 3

ОБОБЩЕН ДОКЛАД В ТАБЛИЧЕН ВИД НА ЕФЕКТИТЕ ВЪРХУ РЕПРОДУКЦИЯТА/РАЗВИТИЕТО

КОНСТАТАЦИИ И ОЦЕНКИ	Стойности				
Дозировка (единици).....	0 (контрол)	...	...	...	...
Стартирани двойки (N)					
Естрален цикъл (поне средна продължителност и честота на нередовни цикли)					
Женски, показващи потвърждение за копулация (N)					
Женски, постигнали забременяване (N)					
Дни от зачеването 1 - 5 (N)					
Дни от зачеването 6 - ... ⁽¹⁾ (N)					
Бременност ≤ 21 дни (N)					
Бременност = 22 дни (N)					
Бременност ≥ 23 дни (N)					
Самки с живородени малки (N)					
Самки с живи малки на 4 ден след раждането (N)					
Импланти/самка (средно)					
Живи новородени/самка при раждането (средно)					
Живи новородени/самка на 4 ден (средно)					
Съотношение на половете (м/ж) при раждането (средно)					
Съотношение на половете (м/ж) на 4 ден (средно)					
Тегло на животните в котилото при раждането (средно)					
Тегло на животните в котилото на 4 ден (средно)					
Тегло на новороденото при раждането (средно)					
Тегло на новороденото към момента на измерване на РЕПО (средно мъжки, средно женски)					
РЕПО на новороденото на същия постнатален ден, раждане — ден 4 (средно мъжки, средно женски, отбелязване PND)					
Тегло на новороденото на 4 ден (средно)					
Тегло на новороденото на 13 ден (средно)					
Запазване на зърната на млечните жлези при мъжките					

¹⁾ последен ден от периода на чифтосване

новородени на ден 13 (средно)					
НОВОРОДЕНИ С АНОМАЛИИ					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с ≥ 2					
ЗАГУБА НА ПОТОМСТВО					
Пренатално (имплантации минус живородени)					
Женски с 0					
Женски с 1					
Женски с 2					
Женски с ≥ 3					
Постнатално (живородени минус живи на постнатален ден 13)					
Женски с 0					
Женски с 1					
Женски с 2					
Женски с ≥ 3					

Б.65 *IN VITRO* МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С МЕМБРАННА БАРИЕРА ЗА КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ КОЖАТА

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 435 (2015). Корозивното действие върху кожата се разбира като причиняване на необратимо увреждане на кожата, проявяващо се като видима некроза през епидермиса и в дермата, настъпило след прилагане на изпитван химикал [както е дефиниран от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетиране на химикали (GHS) на Обединените нации (ООН) (1) и Регламент на Европейския съюз (ЕС) 1272/2008 относно класификацията, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP)]¹ Настоящият метод за изпитване, еквивалентен на актуализираните насоки за изпитване 435 на ОИСП, предоставя *in vitro* метод за изпитване с мембранната бариера, който може да се използва за идентифициране на корозивни химикали. Методът за изпитване използва изкуствена мембрана, проектирана да реагира на корозивни химикали по начин, подобен на животинска кожа *in situ*.
2. Корозията на кожата традиционно се оценява чрез прилагане на изпитвания химикал върху кожата на живи животни и оценяване на степента на увреждане на тъканта след фиксиран период от време (2). Освен настоящия метод за изпитване, са приети множество други методи за изпитване *in vitro* като алтернативи (3)(4) на стандартната *in vivo* процедура с кожа от заек (глава Б.4 от настоящото приложение, еквивалентна на TG 404 на ОИСП), използвана за идентифициране на корозивни химикали (2). Стратегия на GHS на ООН за поетапно изпитване и оценяване за оценката и класификацията на корозията на кожата и Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи за изпитване и оценка (IATA) за кожно дразнене/корозия препоръчват употребата на валидирани и приети *in vitro* методи за изпитване в съответствие с модули 3 и 4 (1)(5). IATA описва няколко модула, които обединяват източници на информация и инструменти за анализ, и предоставя насоки за това i) как да се интегрират и използват съществуващите данни за изпитвания и различни от тези за изпитвания за оценка на потенциала на химикалите за дразнене на кожата и за корозивно действие върху кожата, и ii) предлага подход, когато е

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

необходимо по-нататъшно изпитване, включително когато са определени отрицателни резултати (5). При този модулен подход, положителните резултати от *in vitro* методите за изпитване могат да се използват за класифициране на даден химикал като корозивен, без да е необходимо изпитване върху животни, като така се намалява и рафинира употребата на животни и предотвратяването на болката и стреса, които биха могли да възникнат за животните, ако се използват за тази цел.

3. Изследванията за валидиране са завършени за модела *in vitro* на мембранна бариера, който е наличен в търговската мрежа под името Corrositex® (6)(7)(8) и показват цялостна точност на прогнозиране на корозия на кожата от 79% (128/163), чувствителност от 85% (76/89), и специфичност от 70% (52/74) за база данни от 163 вещества и смеси (7). На базата на неговата потвърдена валидност, този валидиран референтен метод (VRM) се препоръчва за употреба като част от стратегията за поетапно изпитване за оценяване на потенциала за опасност от корозивното действие върху кожата на химикалите (5)(7). Преди *in vitro* модел на мембранна бариера да може да бъде използван за регулаторни цели, следва да се определи неговата надеждност, относимост (точност) и ограничения за предложената употреба, за да се гарантира, че той е сходен с тези на VRM (9), в съответствие с предварително дефинираните Стандарти за ефективност (СЕ) (10). Взаимното приемане на данните от ОИСП се гарантира само след като всеки предложен нов или актуализиран метод, съответстващ на СЕ, е бил разгледан и включен в еквивалентните насоки за изпитване на ОИСП. Понастоящем само един *in vitro* метод е обхванат от насоки за изпитване 435 на ОИСП и този метод за изпитване е наличният в търговската мрежа модел Corrositex®.
4. Други методи за изпитване на корозивно действие върху кожата са базирани на употребата на реконструирана човешка кожа (ОИСП TG 431) (3) и изолирана кожа от плъх (ОИСП TG 430) (4). Настоящите насоки за изпитване осигуряват и подкатегоризация на корозивни химикали в трите подкатегории корозивно действие съгласно GHS на ООН и трите групи опаковки при транспорт на ООН по отношение на опасността от корозивно действие върху кожата. Настоящите насоки за изпитване бяха първоначално приети през 2006 г. и актуализирани през 2015 г., за да включват отпратка към Ръководството за IATA и актуализация на списъка на опитните вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5. Използваните определения са дадени в допълнението.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

6. Изпитването, описано в настоящия метод за изпитване позволява идентификация и подкатегоризация на корозивни изпитвани химикали, съгласно GHS на ООН/CLP (таблица 1). В допълнение, подобен метод за изпитване може да се използва за вземане на решения относно наличието или отсъствието на корозивно действие на специфични класове химикали, *напр.* органични и неорганични киселини, киселинни производни¹ и основи за целите на изпитвания при транспортиране (7)(11)(12). Настоящият метод за изпитване описва обща процедура, сходна с валидирания референтен метод за изпитване (7). Тъй като този метод за изпитване не осигурява адекватна информация за дразненето на кожата, следва да се отбележи, че МИ Б.46 (еквивалентен на TG 439 на ОИСП) специално разглежда въздействието върху здравето - кожно дразнене *in vitro*(13). За пълна оценка на локалното въздействие върху кожата след еднократна дермална експозиция следва да се направи справка с Ръководството на ОИСП относно Интегрираните подходи за изпитване и оценка (5).

Таблица 1: Категория и подкатегории на вещества с корозивно действие върху кожата по GHS на ООН (1)

Категория корозивно действие (категория 1) (за органи, които не използват подкатегории)	Подкатегории за вещества с потенциално корозивно действие ² (за органи, използващи подкатегории, включително Регламент CLP)	Корозивно за ≥ 1 от 3 животни	
		Експозиция	Наблюдение
Корозивен	Корозивно от подкатегория 1A	≤ 3 минути	≤ 1 час
	Корозивно от подкатегория 1B	> 3 минути / ≤ 1 час	≤ 14 дни
	Корозивно от подкатегория 1C	> 1 час / ≤ 4 часа	≤ 14 дни

7. Ограничение на валидирания референтен метод (7) е, че много некорозивни химикали и някои корозивни химикали не изпълняват изискванията за изпитване, въз основа на резултатите от първоначалното изпитване за съвместимост (вж. точка 13). Водните разтвори на химикали с pH от порядъка на 4,5 до 8,5 често не отговарят на

¹ „Киселинно производно“ е обозначение на неспецифичен клас и най-общо се дефинира като киселина, получена от химикал, пряко или чрез модифициране, или частично заместване. Този клас включва анхидриди, халогенни киселини, соли и други видове химикали.

² За ЕС Регламентът CLP се прилага за трите категории корозивно действие върху кожата 1A, 1B и 1C.

изискванията за изпитване; Все пак, 85% от химикалите, изпитани в този обхват на рН, са били некорозивни при изпитвания с животни (7). *In vitro* методът за изпитване с мембранна бариера може да се използва за изпитване на твърди вещества (разтворими или неразтворими във вода), течности (във водни или неводни разтвори) и емулсии. Въпреки това, изпитвани химикали, които не предизвикват откриваема промяна в изпитването за съвместимост (*т.е.* промяна в цвета в Системата за откриване на химикали (CDS) на валидирания референтен метод за изпитване) не могат да бъдат изпитвани по метод за изпитване с мембранна бариера и следва да бъдат изпитвани чрез други методи за изпитване.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

8. Системата за изпитване обхваща два компонента: синтетична макромолекулна био-бариера и система за откриване на химикали (CDS); с помощта на CDS, този метод за изпитване открива увреждане на мембранната бариера, предизвикано от корозивни изпитвани химикали след прилагане на изпитвания химикал върху повърхността на синтетичната макромолекулна мембранна бариера (7), вероятно по същия(същите) механизъм(механизми) за корозия, който(които) действат и на живата кожа.
9. Преминаването през мембранната бариера (или пробива) може да се измери чрез множество процедури или чрез CDS, включително чрез промяна в цвета на индикаторен оцветител за рН или промяна на друго свойство на индикаторния разтвор под бариерата.
10. Мембранната бариера следва да бъде определена като валидна, *т.е.* относима и надеждна с оглед на своето предназначение. Това включва гарантиране, че различните препарати са сходни по отношение на бариерните свойства, *напр.* могат да осигурят постоянна бариера срещу некорозивни химикали, могат да категоризират корозивните свойства на химикалите в рамките на различните подкатегории на корозивност, съгласно GHS на ООН (1). Определената класификация е базирана на времето, което е необходимо на даден химикал да премине през мембранната бариера до индикаторния разтвор.

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

11. Преди рутинната употреба на *in vitro* метода за изпитване с мембранна бариера, който спазва изискванията за този метод за изпитване, лабораториите следва да демонстрират техническа компетентност чрез правилно класифициране на дванадесетте опитни вещества, препоръчани в таблица 2. При ситуации, в които дадено вписано вещество е неналично или когато е обосновано, може да се използва друго вещество, за което има налични адекватни *in vivo* и *in vitro* справочни данни

(напр. от списъка на референтните химикали (10)), при условие че се прилагат същите критерии за избор, които са описани в таблица 1.

Таблица 2: Вещества за изпитване на пригодност¹

Вещество ²	CASRN	Химичен клас	Подкатегория <i>in Vivo</i> по GHS на ООН ³	Подкатегория <i>in Vitro</i> по GHS на ООН ³
Борен трифлуорид дихидрат	13319-75-0	Неорганични киселини	1A	1A
Азотна киселина	7697-37-2	Неорганични киселини	1A	1A
Фосфорен пентахлорид	10026-13-8	Прекурсори на неорганични киселини	1A	1A
Валерил хлорид	638-29-9	Киселинни хлориди	1B	1B
Натриев хидроксид	1310-73-2	Неорганични основи	1B	1B
1-(2-аминоетил) пиперазин	140-31-8	Алифатни амини	1B	1B
Бензенсулфонил хлорид	98-09-9	Киселинни хлориди	1C	1C
N,N-Диметил бензиламин	103-83-3	Анилини	1C	1C
Тетраетиленпентамин	112-57-2	Алифатни амини	1C	1C
Евгенол	97-53-0	Феноли	NC	NC
Нонил акрилат	2664-55-3	Акрилати/метакрилати	NC	NC
Натриев бикарбонат	144-55-8	Неорганични соли	NC	NC

¹Дванадесетте изброени по-горе вещества съдържат три вещества от всяка от трите подкатегории корозивни вещества по GHS на ООН, а също и три некорозивни вещества, като всичките могат лесно да бъдат набавени от доставчици в търговската мрежа, а подкатегорията по GHS на ООН се базира на резултатите от висококачествени *in vivo* изпитвания. Тези вещества са взети от списъка на 40 референтни вещества, които са включени в минималния списък на химикалите, определени за доказване на точността и надеждността на методите за изпитване, които са структурно и функционално сходни с валидирания референтен метод за изпитване, и са избрани измежду 163 референтни химикала, които са използвани първоначално за валидиране на референтния метод за изпитване (Corrositex®) (7) (10) (14). Целта на този процес на подбор бе да включи доколкото е възможно химикали, които: са били представителни за диапазона на реакции на корозивност (напр. некорозивни; Опаковъчни групи на ООН - I, II и III корозивни вещества), които валидирания референтен метод за изпитване може да измери или прогнозира; са били представителни за химичните класове, използвани по време на процедурата за валидация; имат химически структури, които са били добре определени; предизвикват възпроизводими резултати в рамките на валидирания референтен метод за изпитване; предизвикват окончателни резултати при референтното *in vivo* изпитване; са се предлагали в търговската мрежа; и не са били свързани с прекалено високи разходи за обезвреждане (14).

²Вещества, изпитвани в чист вид или с чистота $\geq 90\%$

³Съответстващите групи за опаковане на ООН са I, II и III, респективно, за под-категории 1A, 1B и 1C от GHS

на ООН. NC; Не-корозивни.

ПРОЦЕДУРА

12. Следващите точки описват компонентите и процедурите на метода за изпитване на изкуствена мембранна бариера за оценка на корозивност (7)(15), на базата на текущия VRM, т.е. наличния в търговската мрежа Corrositex[®]. Мембранната бариера и решенията за съвместимост/индикатор и категоризация могат да бъдат конструирани, подготвени и набавени от търговската мрежа, какъвто е случая с VRM Corrositex[®]. Наличен е примерен протокол на метод за изпитване за валидирания референтен метод за изпитване (7). Изпитването следва да бъде извършено при околна температура (17-25°C), а компонентите следва да отговарят на следните условия.

Изпитване за съвместимост на изпитвания химикал

13. Преди извършване на изпитването на мембранната бариера, се прави изпитване за съвместимост, за да се определи дали изпитвания химикал може да се открива от CDS. Ако CDS не открие изпитвания химикал, методът за изпитване на мембранната бариера не е подходящ за оценяване на потенциалната корозивност на този конкретен изпитван химикал и следва да се използва различен метод за изпитване. CDS системата и условията на експозиция, използвани за изпитването за съвместимост следва да отразяват експозицията в последващото изпитване на мембранната бариера.

Изпитване за категоризация на времевата рамка на изпитвания химикал

14. Ако е подходящо за метода на изпитване, изпитван химикал, който е бил квалифициран чрез изпитването за съвместимост, следва да бъде подложен на изпитване за категоризация на времевата рамка, т.е. скринингово изпитване за разграничаване на слаби и силни киселини или основи. Например, в рамките на валидирания референтен метод за изпитване, изпитването за категоризация на времевата рамка се използва, за да покаже коя от двете времеви рамки следва да бъде използвана на базата на това дали е открит значителен резерв от киселина или основа. За определяне на корозивността и подкатегорията на кожна корозивност съгласно GHS на ООН следва да бъдат използвани две различни времеви рамки за пробив, въз основа на киселинния или алкалния резерв на изпитвания химикал.

КОМПОНЕНТИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НА МЕМБРАННАТА БАРИЕРА

Мембранна бариера

15. Мембранната бариера се състои от два компонента: протеинов макромолекулен гел във воден разтвор и пропусклива опорна мембрана. Протеиновият гел следва да бъде

непропусклив за течности и твърди вещества, но може да бъде подложен на корозия и в резултат от това да стане пропусклив. Напълно изградената мембранна бариера следва да се съхранява при предварително определени условия, които доказано изключват влошаване на качествата на гела, *напр.* изсушаване, растеж на микроорганизми, изместване, напукване, които биха влошили ефективността му. Следва да се определи приемливият срок за съхранение и подготвените мембранни бариери да не се използват след този срок.

16. Пропускливата опорна мембрана осигурява механична опора за протеиновия гел по време на процеса на образуване на гела и на експозиция на изпитвания химикал. Опорната мембрана следва да предотвратява провисване или изместване на гела и да пропуска лесно всички изпитвани химикали.
17. Протеиновият гел, съставен от протеин, *напр.* кератин, колаген или смеси от протеини, образувачи гелова матрица, служи като цел за изпитвания химикал. Протеиновият материал се поставя по повърхността на опорната мембрана и се оставя да се превърне в гел, преди да се постави мембранната бариера над индикаторния разтвор. Протеиновият гел следва да бъде с равномерна дебелина и плътност по цялата си площ, и да няма въздушни мехури или дефекти, които биха повлияли върху функционалната му цялост.

Система за откриване на химикали (CDS)

18. Индикаторният разтвор, който е същият разтвор, използван за изпитването за съвместимост, следва да реагира на присъствието на изпитван химикал. Следва да се използва индикаторен оцветител за рН или комбинация от оцветители, *напр.* крезолово червено и метил-оранж, които показват промяна в цвета, в отговор на наличието на изпитвания химикал. Измервателната система може да бъде визуална или електронна.
19. Системите за откриване, които са разработени за откриване на преминаването на изпитвания химикал през бариерната мембрана, следва да бъдат оценявани по тяхната относимост и надеждност, за да се докаже обхватът от химикали, които може да бъдат открити, и количествените лимити на откриване.

ЕФЕКТИВНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

Сглобяване на компонентите на метода за изпитване

20. Мембранната бариера се позиционира в стъкленца (или тръба), съдържаща индикаторния разтвор така, че опорната мембрана да е в пълен контакт с индикаторния разтвор и да няма наличие на въздушни мехури. Трябва да се внимава, за да не се наруши целостта на бариерата.

Прилагане на изпитвания химикал

21. Внимателно се нанася подходящо количество от изпитвания химикал, *напр.* 500 µl течност или 500 mg фино разпрасено твърдо вещество (7) върху горната повърхност на мембранната бариера и се разстила равномерно. За всеки изпитван химикал се подготвя подходящ брой повторения, *напр.* четири (7), както и съответния брой контроли (вж. точки 23 до 25). Времето за прилагане на изпитвания химикал върху мембраната се записва. За да се гарантира, че кратките времена за корозия се записват точно, времената за прилагане на изпитвания химикал по стъклениците на повторенията се подреждат едно след друго.

Измерване на проникванията през мембранната бариера

22. Всяка стъкленица се наблюдава по подходящ начин и времето на първата промяна в индикаторния разтвор, *т.е.* проникването през бариерата, се записва, като се определя изтеклото време между приложението и проникването през мембранната бариера.

Контроли

23. При изпитвания, които включват използването на носител или разтворител с изпитвания химикал, носителят или разтворителят следва да бъдат съвместими със системата на мембранната бариера, *т.е.* да не променят нито целостта на системата на мембранната бариера, нито корозивността на изпитвания химикал. Когато е приложимо, контролът на разтворителя (или носителя) следва да се изпитват паралелно с изпитвания химикал, за да се докаже съвместимостта на разтворителя със системата на мембранната бариера.
24. Положителен (корозивен) контрол с междинна корозивна дейност, *напр.* 110 ± 15 mg натриев хидроксид (подкатегория корозивни вещества 1B по GHS на ООН) (7), следва да се изпитва паралелно с изпитвания химикал, за да се оцени дали системата за изпитване работи по приемлив начин. Втора положителна контрола, която е от същия химичен клас като изпитвания химикал, може да бъде полезна за оценяване на относителния потенциал за корозивност на корозивен изпитван химикал. Следва да се избере(изберат) положителен(-ни) контрол(и), който (които) е/са междинни в своята корозивност (*напр.* под-категория 1B по GHS на ООН), за да се открият промените във времето за проникване, което може да бъде неприемливо дълго или по-кратко от установената референтна стойност, чрез което се посочва, че системата за изпитване не функционира правилно. За целта, използването на крайно корозивни (подкатегория 1A по GHS на ООН) или некорозивни химикали се ограничава. Корозивен химикал от подкатегория 1B по GHS на ООН би позволил откриване на твърде бързо или твърде бавно време за преминаване. Може да се използва слабокорозивен химикал (подкатегория 1C по GHS на ООН) като положителна контрола за измерване на способността на метода за изпитване да разграничава

неизменно слабокорозивните от некорозивните химикали. Независимо от използвания подход, следва да се разработи приемлив диапазон на отклика на положителната контрола на базата на обхвата от стойности на преминаване от предходни периоди за използваните положителни контроли, като например средните $\pm 2-3$ стандартни отклонения. Във всяко проучване, точното време на пробив следва да бъде определено за положителната контрола, така че отклоненията извън приемливия обхват да могат да бъдат открити.

25. Паралелно с изпитвания химикал следва да бъде изпитан и отрицателна (некорозивна) контрола, *напр.* 10% лимонена киселина, 6% пропионова киселина (7) като още една мярка за качествен контрол, за доказване на функционалната цялост на мембранната бариера.

Критерии за приемливост на изследването

26. Съгласно установените времеви параметри за всяка от подкатегиите корозивност на GHS на ООН, изтеклото време (в минути) между приложението на изпитвания химикал върху мембранната бариера и преминаването на бариерата се използва за прогнозиране на корозивността на изпитвания химикал. За да се разглежда едно изследване като приемливо, паралелната положителна контрола следва да дава очакваното време на реакция, т.е., проникване (*напр.* 8-16 минути време на пробив за натриев хидроксид, ако се използва като положителна контрола), паралелната отрицателна контрола не следва да бъде корозивна, а когато е включена, паралелната контрола на разтворителя не следва нито да бъде корозивна, нито да променя корозивния потенциал на изпитвания химикал. Преди рутинна употреба на метод, който се придържа към настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като използват дванадесетте вещества, препоръчани в таблица 2. За новите вариантни методи („me-too“), разработени съгласно настоящия метод за изпитване, които са структурно и функционално сходни с валидирания референтен метод (14), предварително определените стандарти за ефективност следва да бъдат използвани за доказване на надеждността и точността на новия метод преди употребата му за редовни изпитвания (10).

Тълкуване на резултатите и класификация за корозивност на изпитваните химикали

27. Времето (в минути), изтекло между прилагането на изпитвания химикал върху мембранната бариера и проникването през бариерата се използва за класифициране на изпитвания химикал в подкатегиите на корозивни вещества по GHS на ООН (1) и, ако е приложимо, в опаковъчна група на ООН (16). Граничните времеви стойности за всяка от трите корозивни подкатегории се определят за всеки предложен метод за изпитване. Окончателните решения относно граничните времена следва да вземат под внимание нуждата от намаляване до минимум на опасността от подценяване при класифициране на корозивно вещество (*т.е.* неверни отрицателни резултати). В

настоящите насоки за изпитване следва да се използват граничните времена на Corrositex® както са описани в таблица 3, тъй като това е единственият метод за изпитване, който в момента отговаря на насоките за изпитване (7).

Таблица 3: Corrositex® модел за предвиждане

Средно време за пробив (в мин.)		Предвиждане за GHS на ООН ³
Изпитвани химикали от категория 1 ¹ (определени чрез изпитването за категоризация на метода)	Изпитвани химикали от категория 2 ² (определени чрез изпитването за категоризация на метода)	
0–3 мин.	0–3 мин.	Корозивен Незадължителна подкатегория 1A
> 3 до 60 min.	> 3 до 30 min.	Корозивен Незадължителна подкатегория 1B
> 60 до 240 min.	> 30 до 60 min.	Корозивен Незадължителна подкатегория 1C
> 240 мин.	> 60 мин.	Некорозивен

¹ Изпитвани химикали с висок киселинен/алкален резерв (6)

² Изпитвани химикали с нисък киселинен/алкален резерв (6)

³ Подкатегории 1A, 1B и 1C от GHS на ООН, съответстват на групи за опаковане на ООН I, II и III, респективно

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

28. Времето (в минути), което е изтекло между приложение и проникването през бариерата на изпитвания химикал и положителната(те) контрола(и) следва да бъде протоколирано в таблична форма като отделни данни за повторение, както и като средна стойност ± стандартното отклонение за всяко изпитване.

Протокол от изпитването

29. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал и контролни вещества:

- Вещество с една съставка: химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.;
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес: характеризирано, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките;
- Външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физикохимични свойства;
- източник, номер на партидата, при наличност;
- Обработка на изпитвания химикал/веществото за контроли преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна;
- Условия за съхранение.

Носител:

- химично идентифициране, концентрация (когато е необходимо), използван обем;
- обосноваване на избора на носител.

Използван модел in vitro на мембранна бариера и протокол, включително доказана точност и надеждност

Условия на изпитване:

- Описание на използваната опитна постановка и подготвителни процедури;
- източник и състав на използваната мембранна бариера *in vitro*;
- състав и свойства на индикаторния разтвор;
- метод на откриване;
- количества на изпитвания химикал и контролните вещества;
- брой на повторенията;
- описание и обосновка на изпитването за категоризация на времевата рамка;
- метод на прилагане;
- периоди за наблюдение.
- описание на приложените критерии за оценка и класификация;

- доказване на компетентност на изпълнение на метода за изпитване преди редовна употреба чрез изпитване на химикалите за изпитване за пригодност.

Резултати:

- представяне в табличен вид на отделните необработени данни от индивидуалното изпитване и контролните проби за всяко повторение;
- описание на други наблюдавани ефекти;
- получената класификация по отношение на използвания модел за прогнозиране/критериите за вземане на решение.

Обсъждане на резултатите

Заключения

ЛИТЕРАТУРА

- (2) Глава Б.4 от настоящото приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху кожата.
- (3) Глава Б.40bis от настоящото Приложение, *In Vitro* корозивно действие върху кожата: Метод за изпитване с реконструиран човешки епидермис (RhE).
- (4) Глава .40 от настоящото Приложение, *In Vitro* корозивно действие върху кожата: Транскутанно електрическо съпротивление (TER).
- (15)

Допълнение

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи делът на верните резултати при даден метод за изпитване (9).

Химикал: Вещество или смес.

Система за откриване на химикали (CDS): Визуална или електронна система за измерване с индикаторен разтвор, която реагира на присъствието на изпитван химикал, *напр.* чрез промяна в индикаторния оцветител за рН, или комбинация от оцветители, които показват промяна в цвета като реакция на наличието на изпитвания химикал, или чрез други видове химични или електрохимични реакции.

Съответствие: Това е мярка за ефективността на метода за изпитване за методи, които дават категоричен резултат и е един от аспектите на неговата относимост. Терминът понякога се използва взаимозаменяемо с термина „точност“ и се определя като делът на всички изпитани химикали, които са правилно класифицирани като положителни или отрицателни. Съответствието зависи в голяма степен от преобладаването на положителните контроли сред видовете на текущо изпитвания химикал (9).

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

IATA: Интегриран подход към изпитването и оценката.

Смес: смес или разтвор, съставен от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез

смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

НС: Некорозивен.

Стандарти за ефективност: стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който по своя механизъм и функционално е сходен с валидирания метод. Включени са i) съществени компоненти на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтни химикали, подбрани между химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (9).

Относимост: Описание на взаимовръзката между метода на изпитване и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (9).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (9).

Чувствителност: Относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (9).

Корозивно действие върху кожата *in vivo*: Причиняването на необратимо увреждане на кожата; а именно видима некроза през *епидермиса* и в дермата след прилагане на изпитван химикал в течение на не повече от четири часа. Характерните прояви на корозивно действие включват язви, кръвене, кръвави струпеи, а до края на 14-дневния период на наблюдение се появява обезцветяване, предизвикано от избледняване на кожата, области с пълна алопеция и цикатрикси. Хистопатологията трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните увреждания.

Специфичност: Относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на метода за изпитване (9).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всякакви добавки, необходими за запазване на стабилността му, както и всякакви онечиствания, произтичащи от използваната технология, но с изключение на разтворители, които могат да бъдат

отделени, без да се засегне стабилността на веществото или да се промени съставът му.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Б.66 *IN VITRO* ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ТРАНСАКТИВАЦИЯ ЧРЕЗ СТАБИЛНО ТРАНСФЕКТИРАНЕ С ЦЕЛ ОТКРИВАНЕ НА АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ НА ЕСТРОГЕННИ РЕЦЕПТОРИ

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

Насоки за изпитване на ОИСП, базирани на ефективност

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 455 (2016). TG 455 са насоки за изпитване, базирани на ефективност (PBTG), описващи методиката за *In Vitro* изследвания за трансактивация чрез стабилно трансфектиране с цел откриване на агонисти и антагонисти на естрогенни рецептори (ER TA изследвания). Състоят се от няколко механистично и функционално сходни методи за изпитване за идентифициране на агонисти и антагонисти на естрогенни рецептори (т.е. ER α , и/или ER β) и следва да улесняват разработването на нови подобни или модифицирани методи за изпитване в съответствие с принципите за валидиране, установени в Ръководството на ОИСП относно валидирането и международното приемане на нови или актуализирани методи за изпитване за оценка на опасности (1). Напълно валидираните референтни методи за изпитване (допълнение 2 и допълнение 3), които осигуряват основата за настоящите PBTG, са:
 - Изследване чрез стабилно трансфектиране TA (STTA) (2), използващо клетъчната линия (h) ER α -HeLa-9903; както и
 - изследването VM7Luc ER TA (3), използващо клетъчната линия VM7Luc4E2¹, която преобладаващо експресира hER α с известно допълнение от hER β (4)(5).

За разработването и валидирането на подобни изследвания за същата крайна точка на опасност следва да се използват наличните стандарти за ефективност

¹ Преди юни 2016 г., тази клетъчна линия се обозначаваеше като клетъчна линия BG1Luc. Клетките BG-1 бяха описани за първи път от Geisinger et al. (1998 г.) (35), а по-късно бяха характеризирани от изследователи от National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Относително скоро бе открито съществуването на два различни варианта на клетките BG-1, използвани от изследователите, BG-1 Fg и BG-1 NIEHS. Бе извършен задълбочен анализ, включително ДНК изпитване на тези два варианта на клетъчните линии на BG-1 от Li и сътрудници (2014 г.) (37), който показва, че BG-1 Fg е уникална, а BG-1 NIEHS, т.е. оригиналната клетъчна линия, използвана за разработване на изследването, не е клетъчната линия BG1 на човешки овариален карцином, а е вариант на клетъчната линия MCF7 на човешки рак на гърдата. Клетъчната линия, използвана в изследването, която първоначално се е наричала BG1Luc4E2 (38), сега ще бъде обозначена като VM7Luc4E2 („V“ = вариант; „M7“ = MCF7 клетки). По същия начин, изследването вече ще се обозначава като VM7Luc ER TA. Макар това да променя произхода на клетъчната линия, на която се базира изследването, то не оказва влияние върху публикуваните валидационни изследвания, нито полезността и приложението на настоящото изследване за скрининг на естрогенни/анти-естрогенни химикали.

(СЕ) (6) (7). Те позволяват навременно изменение на PBTG 455 така, че да могат да се добавят нови подобни изследвания към актуализираните PBTG; въпреки това обаче, подобни изследвания се добавят едва след като бъдат прегледани от ОИСП и бъде сметнато, че отговарят на стандартите за ефективност. Всички изследвания, включени в TG 455, могат да се използват, за да се покрият изискванията на държавите за резултати от изпитвания относно трансактивация на естрогенни рецептори, като същевременно се възползват от предимствата на Взаимното приемане на данни.

Контекст и принципи на изследванията, включени в настоящия метод за изпитване

2. През 1998 г. ОИСП инициира дейност с висок приоритет за преразглеждане на съществуващите и разработване на нови насоки за изпитване при провеждане на скрининг и изпитване на химикали, които имат потенциала да нарушават функциите на ендокринната система. Концептуалната рамка (КР) на ОИСП за изпитване и оценяване на химикали, които имат потенциала да нарушават функциите на ендокринната система бе преразгледана през 2012 г. Оригиналната и преразгледаната КР са включени в приложенията към Ръководството на ОИСП относно стандартизираните насоки за изпитване за оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система (8). КР обхваща пет нива, като всяко ниво отговаря на различно ниво на биологична комплексност. ER изследванията за трансактивиране (ТА), описани в настоящия метод за изпитване, са от ниво 2, което включва „изследвания *in vitro*, осигуряващи данни за избран(и) ендокринен(ни) механизъм(-ми)/път(-ица)“. Този метод за изпитване е за изпитвания *in vitro* за трансактивиране (ТА), предвидени за идентифициране на агонисти и антагонисти на естрогенни рецептори (ER).
3. Взаимодействието на естрогените с ER може да окаже въздействие върху транскрипцията на естроген-контролираните гени, които могат да причинят индуциране или инхибиране на клетъчни процеси, включително тези, които са необходими за клетъчната пролиферация, нормалното развитие на зародиша и репродуктивната функция (9)(10)(11). Смушението на функцията на нормалните естрогенни системи може да причини евентуални неблагоприятни ефекти върху нормалното развитие (онтогенеза), репродуктивното здраве и целостта на репродуктивната система.
4. *In vitro* ТА изследванията са базирани на пряко или непряко взаимодействие на веществата със специфичен рецептор, който регулира транскрипцията на продуктите на репортерния ген. Такива изследвания са широко използвани за оценяване на генната експресия, регулирана от специфични нуклеарни рецептори, като например ER (12) (13) (14) (15) (16). Те са предложени за откриване на естрогенна трансактивация, регулирана от ER (17) (18) (19). Има най-малко два основни под-типа нуклеарни ER, α и β , които са кодирани от определени гени. Съответните протеини има различни биологични функции, както и различно тъканно разпределение и лиганд-свързващ афинитет

(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Нуклеарният ER α медира класическия естрогенен отклик (27)(28)(29)(30), и поради това повечето модели, които се разработват в момента за измерване на активирането или инхибирането на ER, са специфични за ER α . Изследванията се използват за идентифициране на химикали, които активират (или потискат) ER след свързване с лиганда, след което лиганд-рецепторният комплекс се свързва със специфичните елементи на отклика на ДНК и трансактивира репортерен ген, което води до повишена клетъчна експресия на маркирания протеин. В тези изследвания могат да се използват различни отговори на репортерите. При системите, базирани на луцифераза, луциферазният ензим трансформира луцифериновия субстрат до био-луминесцентен продукт, който може да се измери количествено с помощта на луминометър. Други примери за често срещани репортерни гени са флуоресцентния протеин и генът *LacZ*, който кодира β -галактосидазата, ензим, който преобразува безцветния субстрат Х-гал (5-бромо-4-хлоро-индолил-галактопиранозид) в син продукт, който може да се определи количествено с помощта на спектрофотометър. Тези репортери могат да бъдат измерени бързо и евтино с тестови китове, налични в търговската мрежа.

5. Валидационните изпитвания на STTA и изследванията VM7Luc TA доказаха тяхната относимост и надеждност за предвидената цел (3)(4)(5)(30). Стандартите за ефективност за базираните на луминесценция ER TA изследвания, използващи клетъчни линии от гърдна тъкан, са включени в Доклада за оценка на метода за изпитване на ICCVAM относно метода за изпитване LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* изследване за идентифициране на агонистично и антагонистично действие на химикали върху човешки естрогенен рецептор (3). Тези стандарти за ефективност са модифицирани, за да бъдат приложими както за STTA, така и за VM7Luc TA изследванията (2).
6. Използваните определения и съкращения в рамките на настоящия метод за изпитване, са описани в допълнение 1.

Обхват и ограничения, свързани с TA изследванията

7. Тези изследвания се предлагат за целите на скрининговите изпитвания и определянето на приоритети, но могат да предоставят и механистична информация, която може да се използва при подход, при който се отчита значимостта на доказателствения материал. Те се занимават с TA, предизвикана от химично свързване с ER в *in vitro* система. Поради това резултатите не бива да бъдат директно екстраполирани към комплексното сигнализиране и регулиране на здравата ендокринна система *in vivo*.
8. Медираната от ER TA се разглежда като един от ключовите механизми за нарушение на функциите на ендокринната система (ED), въпреки че има и други механизми, чрез които може да възникне ED, включително i) взаимодействия с други рецептори и ензимни системи в рамките на

ендокринната система, ii) синтез на хормони, iii) метаболитно активиране и/или деактивиране на хормони, iv) разпределение на хормони в прицелните тъкани и v) клиърънс на хормони от организма. Нито едно от изследванията съгласно този метод за изпитване не се занимава с тези режими на действие.

9. Настоящият метод за изпитване се занимава със способността на химикалите да активират (т.е. да действат като агонисти) и да потискат (т.е. да действат като антагонисти) транскрипция, зависеща от ER. Някои химикали, които могат по начин, зависещ от типа на клетките, да проявяват както агонистична, така и антагонистична активност, са известни като селективни модулатори на естрогенните рецептори (СМЕР). Химикалите, които дават отрицателен резултат в тези изследвания, биха могли да бъдат оценени в рамките на изследване за свързване на ER, преди да се заключи, че този химикал не се свързва с рецептора. В допълнение, вероятно е изследванията само да дадат информация за действието на родителската молекула, като се имат предвид ограничените способности за метаболизъм на *in vitro* клетъчните системи. Като се има предвид, че по време на валидацията са използвани само единични вещества, приложимостта върху изпитвани смеси не е разглеждана. Независимо от това методът на изпитване е теоретично приложим за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси. Преди използването на метода на изпитване по отношение на вещества с повече съставки, UVCB или смес, с цел генериране на данни за предвидената регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.
10. За информационни цели, таблица 1 предоставя резултатите от изпитване на агонисти за 34-те вещества, които бяха изпитани в рамките на двата напълно валидирани референтни методи на изпитване, описани в настоящия метод за изпитване. Въз основа на публикуваните протоколи 26 от тези вещества се класифицират като определени агонисти на ER, а 8 са отрицателни, включително при изследвания *in vitro* за свързване на ER и TA, и/или утеротрофичното изследване (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). Таблица 2 предоставя резултатите от изпитване на антагонисти за 15-те вещества, които бяха изпитани в рамките на двата напълно валидирани референтни методи на изпитване, описани в настоящия метод за изпитване. От тези вещества, въз основа на публикуваните протоколи, 4 се класифицират като определени/предполагаеми антагонисти на ER и 10 са отрицателни, включително при изследвания *in vitro* за свързване на ER и изследване за TA (2)(3)(18)(31). Като се имат предвид данните, обобщени в таблица 1 и таблица 2, бе постигнато 100% съгласие между двата референтни метода на изпитване относно класифицирането на всички вещества, с изключение на едно вещество (Мифепристон) за изследването с антагонисти, като всяко вещество бе правилно класифицирано като агонист/антагонист на ER или като отрицателно. Допълнителна информация за тази група химикали, както и за

допълнителните химикали, изпитвани в рамките на изследванията STTA и VM7Luc ER TA по време на изследванията за валидиране, е предоставена в Стандартите за ефективност за ERTA (6)(7), допълнение 2 (таблици 1, 2 и 3).

Таблица 1: Общ преглед на резултатите от изследванията STTA и VM7Luc ER TA за вещества, изпитани в двете изследвания с агонисти и класифицирани като агонисти на ER (POS) или отрицателни (NEG)

	Вещество	CAS №	Изследване ¹ STTA			Изследване ² VM7Luc ER TA		Източник на данните за класифицирането ⁴		
			ER TA Дейност	Стойност PC10 (M)	Стойност PC50 ^b (M)	Активност ER TA	Стойност EC50 ^{b,3} (M)	Други ER TA ^c	ER Свързващи вещества	Утеротрофично
1	17β-естрадиол	50-28-2	POS	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POS	5,63 × 10-12	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-естрадиол	57-91-0	POS	7,24 × 10-11	6,44 × 10-10	POS	1,40 × 10-9	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-етинил естрадиол	57-63-6	POS	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POS	7,31 × 10-12	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-треболон	10161-33-8	POS	1,78 × 10-8	2,73 × 10-7	POS	4,20 × 10-8	POS (2/2)	NT	NT
5	19-нортестостерон	434-22-0	POS	9,64 × 10-9	2,71 × 10-7	POS	1,80 × 10-6	POS(4/4)	POS	POS
6	4-кумилфенол	599-64-4	POS	1,49 × 10-7	1,60 × 10-6	POS	3,20 × 10-7	POS(5/5)	POS	NT
7	4-трет-октилфенол	140-66-9	POS	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	POS	3,19 × 10-8	POS(21/24)	POS	POS
8	Апигенин	520-36-5	POS	1,31 × 10-7	5,71 × 10-7	POS	1,60 × 10-6	POS(26/26)	POS	NT
9	Атразин	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Бисфенол А	80-05-7	POS	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	POS	5,33 × 10-7	POS(65/65)	POS	POS
11	Бисфенол Б	77-40-7	POS	2,36 × 10-8	2,11 × 10-7	POS	1,95 × 10-7	POS(6/6)	POS	POS
12	Бутилбензил фталат	85-68-7	POS	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	POS	1,98 × 10-6	POS(12/14)	POS	NEG
13	Кортикостерон	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Куместрол	479-13-0	POS	1,23 × 10-9	2,00 × 10-8	POS	1,32 × 10-7	POS(30/30)	POS	NT
15	Дайдзеин	486-66-8	POS	1,76 × 10-8	1,51 × 10-7	POS	7,95 × 10-7	POS(39/39)	POS	POS
16	Диетилстилбестрол	56-53-1	POS	<1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	POS	3,34 × 10-11	POS(42/42)	POS	NT
17	Ди-п-бутил фталат	84-74-2	POS	4,09 × 10-6		POS	4,09 × 10-6	POS(6/11)	POS	NEG
18	Етил парабен	120-47-8	POS	5,00 × 10-6	(няма PC50)	POS	2,48 × 10-5	POS		NT
19	Естрон	53-16-7	POS	3,02 × 10-11	5,88 × 10-10	POS	2,34 × 10-10	POS(26/28)	POS	POS
20	Генистеин	446-72-0	POS	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	POS	2,71 × 10-7	POS(100/102)	POS	POS
21	Халоперидол	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Кемпферол	520-18-3	POS	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	POS	3,99 × 10-6	POS(23/23)	POS	NT
23	Кепон	143-50-0	POS	7,11 × 10-7	7,68 × 10-6	POS	4,91 × 10-7	POS(14/18)	POS	NT
24	Кетоконазол	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Линурон	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	мезо-Хексестрол	84-16-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Метил тестостерон	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Морин	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Норетинодрел	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	<i>p,p'</i> -Метоксихлор	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(няма PC50) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Фенобарбитал	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
32	Резерпин	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Спиринолактон	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Тестостерон	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS; M = моларна; EC50 = половината от максимално ефективната концентрация на изпитваното вещество; NEG = отрицателен; POS = положителен; NT = неизпитан; PC10 (и PC50) = концентрацията на изпитваното вещество, при което реакцията е 10% (или 50 % за PC50) от реакцията, предизвикана от положителната контрола (E2, 1nM) във всяка плака.

^a Обикновени вещества, изпитани чрез изследванията STTA и VM7Luc ER TA, които са определени като агонисти на ER или ER-отрицателни, и се използват за оценяване на точността в рамките на изследването за валидиране VM7Luc ER TA (ICCVAM VM7Luc ER TA Доклад за оценка, таблица 4-1 (3)).

⁶ Максималната изпитана концентрация при отсъствието на ограничения поради цитотоксичност или неразтворимост беше 1×10^{-5} M (STTA изследване) и 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA изследване).

^a Числото в скобите представлява резултатите от изпитването, класифицирани като положителни (POS) или отрицателни (NEG) спрямо общия брой на споменатите проучвания.

¹ Стойности, докладвани в Проекта за протокол от Предвалидационното междулабораторното изследване за валидиране на изследване за транскрипционна активация (ТА) чрез стабилно трансфектиране с цел откриване на естрогенна активност - Изследването за алфа-медиран репортерен ген за човешки естрогенен рецептор с използване на клетъчна линия hER-HeLa-9903 (2)

² Доклад за оценяване на метод за изпитване на ICCVAM относно метода за изпитване LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* метод за откриване на агонисти и антагонисти на ER (3)

³ Средните стойности за EC50 бяха изчислени с помощта на стойностите, докладвани от лабораториите при изследването за валидиране VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, и Hiyoshi) (3).

⁴ Класифицирането като агонист на ER или отрицателно вещество е въз основа на информацията в документите за контекстуален преглед (BRD) на ICCVAM за свързване на ER и методите за изпитване за ТА (31), както и на информацията, получена от публикуваните и прегледани данни след завършване на BRD на ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Забележки Във всяко изследване в рамките на настоящия метод за изпитване има различни измервания. В някои ситуации стойността за EC₅₀ не може да бъде изчислена, защото не е генерирана пълната крива на зависимостта доза-отклик. Въпреки че при изследването STTA стойността PC10 е ключова мярка, може да има и допълнителни примери, в които PCx предоставя полезна информация.

Таблица 2: Сравнение на резултатите от изследванията STTA и VM7Luc ER TA за вещества, изпитани в двете изследвания с антагонисти и класифицирани като антагонисти на ER (POS) или отрицателни (NEG)

	Вещество ^a	CAS №	Изследване ¹ ER STTA		Изследване ² VM7Luc ER TA		ER STTA кандидат ефекти ⁴	ICCVAM ⁵ Консенсусна класификация	MeSH ⁶ Химичен клас	Клас на продукта ⁷
			ER TA Дейност	IC ₅₀ стойност ^b (M)	ER TA Дейност	IC ₅₀ стойност ^{b,3} (M)				
1	4-хидрокситамоксифен	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	умерено POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
2	Дибензо[a,h]антрацен	53-70-3	POS	Няма IC ₅₀	POS	Няма IC ₅₀	POS	PP	Полициклично съединение	Лабораторен химикал, природен продукт
3	Мифепристон	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	слабо POS	NEG	Стероид	Фармацевтични продукти
4	Ралоксифен HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	умерено POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
5	Тамоксифен	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
6	17β-естрадиол	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
7	Апигенин	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Хетероциклично съединение	Оцветител, природен продукт, междинен фармацевтичен продукт
8	Атразин	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Хетероциклично съединение	Хербицид
9	Ди-п-бутилфталат	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Естер, Фталова киселина	Козметична съставка, индустриален химикал, пластификатор
10	Фенаримол	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	неизпитан	PN	Хетероциклено съединение, пиримидин	Фунгицид
11	Флавон	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Флавоноид, хетероциклено съединение	Природен продукт, фармацевтичен продукт
12	Флутамид	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Амид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
13	Генищайн	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Флавоноид, хетероциклено	Природен продукт, фармацевтичен продукт

									съединение	
14	p-п-нонилфенол	104-40-5	NEG	-	NEG	-	неизпитан	NEG	Фенол	Междиен химикал
15	Ресвератрол	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Въглеродород (цикличен)	Природен продукт

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS; M = моларна; IC₅₀ = половината от максималната предизвикваща потискане концентрация на изпитваното вещество; NEG = отрицателен; PN = приема се за отрицателен; POS = положителен; PP = приема се за положителен.

^aОбикновени вещества, изпитани чрез изследванията STTA и VM7Luc ER TA, които са определени като антагонисти на ER или ER-отрицателни и се използват за оценяване на точността в рамките на изследването за валидиране VM7Luc ER TA (2) (3).

^bМаксималната изпитана концентрация при отсъствието на ограничения поради цитотоксичност или неразтворимост беше 1 x 10⁻³ M (STTA изследване) и 1 x 10⁻⁵ M (VM7Luc ER TA изследване).

¹ Валидационният доклад за изследване за транскрипционна активация (TA) чрез стабилно трансфектиране с цел откриване на ER-медирана активност, Част Б (2)

² Доклад за оценяване на метод за изпитване на ICCVAM относно метода за изпитване LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* метод за откриване на агонисти и антагонисти на ER (3).

³ Средните стойности за IC₅₀ бяха изчислени с помощта на стойностите, докладвани от лабораториите при изследването за валидиране VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM и Hiyoshi) (3).

⁴ ER STTA активността, приета въз основа на докладваното им въздействие, известно от данните от предходни периоди на CERi за изследването за свързване на ER рецептора, утеротрофичното изследване и информацията, събрана от свободно достъпната литература (2)

⁵ Класифицирането като антагонист на ER или отрицателно вещество е въз основа на информацията в документите за контекстуален преглед (BRD) на ICCVAM за свързване на ER и изследванията за TA (31), както и на информацията, получена от публикуваните и прегледани данни след завършване на BRD документите на ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Веществата бяха причислени към един или повече химични класове, като се използва системата MeSH на Националната библиотека по медицина на САЩ, международно призната стандартизирана схема за класификация (налична на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Веществата бяха причислени към един или повече продуктови класове, като се използва Базата данни на опасните вещества на Националната библиотека по медицина на САЩ (налична на адрес: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

КОМПОНЕНТИ НА ER TA ИЗСЛЕДВАНЕТО

Съществени компоненти на изследването

11. Настоящият метод за изпитване се прилага за изследвания, използващи стабилно трансфектиран или ендогенен ER α рецептор и модел на стабилно трансфектиран репортерен ген при контрола на един или повече елементи за естрогенен отклик; въпреки това могат да бъдат налични и други рецептори, напр. ER β . Това са съществените компоненти на изследването.

Контроли

12. Следва да се опише основата на предложените паралелни референтни еталони за всяко изследване с агонисти и антагонисти. Паралелните контроли (отрицателни, на разтворител и положителни), според случая служат за индикация, че изследването се изпълнява съгласно условията за изпитване и осигурява база за сравнение между отделните експерименти; те обикновено са част от критериите за приемливост за даден експеримент (1).

Стандартни процедури за контрол на качеството

13. Стандартните процедури за контрол на качеството следва да се изпълняват, както е описано за всяко изследване, за да се гарантира, че клетъчната линия остава стабилна при множество преминавания, остава свободна от микопlasма (т.е. без бактериално замърсяване) и съхранява способността си да предоставя очакваните ER-медирирани отговори във времето. Клетъчните линии следва да бъдат допълнително проверени за правилната им идентичност, както и за други замърсители (напр. гъбички, дрожди и вируси).

Доказване на пригодността на лабораторията

14. Преди да изпитва непознати химикали с някое от изследванията съгласно настоящия метод за изпитване, всяка лаборатория следва да докаже пригодността си да използва изследването. За да докаже пригодност, всяка лаборатория следва да изпита 14-те вещества за изпитване за пригодност, изброени в таблица 3, в изследване с агонисти и 10-те вещества за изследване за пригодност от таблица 4 в изследването с антагонисти. Това изпитване за пригодност ще потвърди и способността за реагиране на изпитваната система. Списъкът на веществата за изпитване за пригодност е подмножество на референтните вещества, посочени в Стандартите за ефективност за ER TA изследванията (6). Тези вещества могат да се намерят в търговската мрежа, представляват класове химикали, които обикновено се асоциират с активността на агонисти или антагонисти на ER, проявяват подходящ диапазон на потентност, очаквана за агонисти/антагонисти ER (т.е. силни до слаби) и включват отрицателни контроли. Изпитването на веществата за изпитване за пригодност следва да се повтори

най-малко два пъти, в различни дни. Пригодността се доказва чрез правилното класифициране (положително/отрицателно) на всяко опитно вещество. Изпитването за пригодност следва да бъде повторено от всеки техник, когато се запознава с изследванията. В зависимост от типа на клетките, някои от тези опитни вещества може да се държат като SERM (селективни естроген-рецепторни модулатори) и да проявяват активност както на агонисти, така и на антагонисти. Въпреки това обаче, опитните вещества се класифицират в таблици 3 и 4 по тяхната известна преобладаваща активност, която следва да се използва за оценяване на пригодността.

15. За да докаже ефективността си и за целите на контрол на качеството, всяка лаборатория следва да събере база данни от агонисти и антагонисти от предходни периоди с референтния еталон (напр. 17β -естрадиол и тамоксифен), химикали за положителни и отрицателни контроли и данни за контрол на разтворителя (напр. DMSO). Като начало, базата данни следва да бъде генерирана от най-малко 10 независими серии с агонисти (напр. 17β -естрадиол) и 10 независими серии с антагонисти (напр. тамоксифен). Резултатите от бъдещите анализи на тези референтни еталони и контролите на разтворителите следва да бъдат добавени, за да се разшири базата данни и да се осигури последователност и ефективност на биологичното изследване от лабораторията във времето.

Таблица 3: Списък на (14) вещества за изследване за пригодност в изследване с агонисти⁸

№ ⁷	Вещество	CAS №	Очаквана реакция ¹	STTA изследване			VM7Luc ER TA изследване		Химичен клас ⁵ по MeSH	Продуктов клас ⁶
				PC ₁₀ стойност (M) ²	PC ₅₀ стойност (M) ²	Диапазон на конц. при изпитване (M)	VM7Luc EC ₅₀ стойност (M) ³	Най-висока конц. за определянето на обхвата (M) ⁴		
14	Диетилстилбестрол	56-53-1	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,04 × 10 ⁻¹¹	10-14 – 10-8	3,34 × 10 ⁻¹¹	3,73 × 10 ⁻⁴	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтичен ветеринарен агент
12	17α-естрадиол	57-91-0	POS	4,27 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	10-11 – 10-5	1,40 × 10 ⁻⁹	3,67 × 10 ⁻³	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
15	мезо-хексестрол	84-16-2	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,75 × 10 ⁻¹¹	10-11 – 10-5	1,65 × 10 ⁻¹¹	3,70 × 10 ⁻³	Въглеродород (цикличен), фенол	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
11	4-трет-октилфенол	140-66-9	POS	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	3,19 × 10 ⁻⁸	4,85 × 10 ⁻³	Фенол	Междинен химикал
9	Генищайн	446-72-0	POS	2,24 × 10 ⁻⁹	2,45 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	2,71 × 10 ⁻⁷	3,70 × 10 ⁻⁴	Флавоноид, хетероциклено съединение	Природен продукт, фармацевтичен продукт
6	Бисфенол А	80-05-7	POS	2,02 × 10 ⁻⁸	2,94 × 10 ⁻⁷	10-11 – 10-5	5,33 × 10 ⁻⁷	4,38 × 10 ⁻³	Фенол	Междинен химикал
2	Кемпферол	520-18-3	POS	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	3,99 × 10 ⁻⁶	3,49 × 10 ⁻³	Флавоноид, хетероциклено съединение	Природен продукт
3	Бутилбензил фталат	85-68-7	POS	1,14 × 10 ⁻⁶	4,11 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	1,98 × 10 ⁻⁶	3,20 × 10 ⁻⁴	Карбоксилова киселина, естер, фталова киселина	Пластификатор, индустриален химикал
4	p,p'-Метоксихлор	72-43-5	POS	1,23 × 10 ⁻⁶	-	10-11 – 10-5	1,92 × 10 ⁻⁶	2,89 × 10 ⁻³	Въглеродород (халогениран)	Пестицид, ветеринарен агент
1	Етил парабен	120-47-8	POS	5,00 × 10 ⁻⁶	-	10-11 – 10-5	2,48 × 10 ⁻⁵	6,02 × 10 ⁻³	Карбоксилна киселина, фенол	Фармацевтичен продукт, Консервант
17	Атразин	1912-24-9	NEG	-	-	10-10 – 10 ⁻⁴	-	4,64 × 10 ⁻⁴	Хетероциклено съединение	Хербицид
20	Спиринолактон	52-01-7	NEG	-	-	10-11 – 10 ⁻⁵	-	2,40 × 10 ⁻³	Лактон, стероид	Фармацевтични продукти
21	Кетоконазол	65277-42-1	NEG	-	-	10-11 – 10 ⁻⁵	-	9,41 × 10 ⁻⁵	Хетероциклено съединение	Фармацевтични продукти
22	Резерпин	50-55-5	NEG	-	-	10-11 – 10 ⁻⁵	-	1,64 × 10 ⁻³	Хетероциклено съединение,	Фармацевтичен

									индол	продукт, ветеринарен агент

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS; EC50 = половината от максимално ефективната концентрация на изпитваното вещество; NEG = отрицателен; POS = положителен;
PC10 (и PC50) = концентрацията на изпитваното вещество, при което реакцията е 10% (или 50 % за PC50) от реакцията, предизвикана от положителната контрола (E2, 1nM) във всяка плака.

¹Класифицирането като положително или отрицателно вещество за активността на антагонист на ER е въз основа на информацията в Информационните документи за преглед (BRD) на ICCVAM за свързване на ER и изследванията за TA (31), както и на емпиричните данни и друга информация, получени от споменатите проучвания, публикувани и прегледани след завършване на BRD документите на ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

²Стойности, докладвани в проекта за протокол на предвалидационното междулабораторноизследване за валидиране за изследване за транскрипционна активация (TA) чрез стабилно трансфектиране с цел откриване на естрогенна активност - Изследването за алфа-медиран репортерен ген за човешки естрогенен рецептор с използване на клетъчна линия hER-HeLa-9903 (30).

³ Средните стойности за EC50 бяха изчислени с помощта на стойностите, докладвани от лабораториите при изследването за валидиране VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, и Hiyoshi) (3).

⁴Докладваните концентрации бяха най-високите изпитани такива (за определяне на обхвата) по време на валидирането на изследването VM7Luc ER TA. В случай, че концентрациите се различават между отделните лаборатории, докладвана е най-високата концентрация. Вижте таблица 4-10 от Протокола за оценка на метода за изпитване на ICCVAM; Методът LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* изследване за идентифициране на агонистично и антагонистично действие на химикали върху човешки естрогенен рецептор (3).

⁵Веществата бяха причислени към един или повече химични класове, като се използва National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), международно призната стандартизирана схема за класификация (налична на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Веществата бяха причислени към един или повече продуктови класове, като се използва базата данни на опасните вещества на Националната библиотека по медицина на САЩ (налична на адрес: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

⁷От таблица 1 (Списък на референтните химикали (22) за оценяване на точността на агонист на ER) на Стандартите за ефективност (6)

⁸Ако дадено вещество за изпитване на пригодност вече не се предлага в търговската мрежа, може да се използва вещество със същата класификация и сравнима сила, начин на действие и химичен клас.

Таблица 4: Списък на (10) вещества за изпитване на пригодност за изследване на антагонисти

	Вещество ^a	CAS №	Изследване ¹ ER STTA			Изследване ² VM7Luc ER TA			ER STTA ¹ кандидат, ефекти	ICCVAM ⁵ Консенсусна класификация	MeSH ⁶ Химичен клас	Клас на продукта ⁷
			Активност ER TA	IC ₅₀ (M)	Диапазон на конц. при изпитване (M)	Активност ER TA	IC ₅₀ ³ (M)	Най-висока конц. за определянето на обхвата (M) ⁴				
1	4-хидрокситамоксифен	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	умерено POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
2	Ралоксифен HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	умерено POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
3	Тамоксифен	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтични продукти
4	17β-естрадиол	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	да бъде отрицателно*	PN	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
5	Апигенин	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Хетероциклено съединение	Оцветител, природен продукт, междинен фармацевтичен продукт
6	Ди-п-бутилфталат	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Естер, Фталова киселина	Козметична съставка, индустриален химикал, пластификатор
7	Флавон	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	да бъде отрицателно*	PN	Флавоноид, хетероциклено съединение	Природен продукт, фармацевтичен продукт
8	Генищайн	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	да бъде отрицателно*	NEG	Флавоноид, хетероциклено съединение	Природен продукт, фармацевтичен продукт
9	p-п-нонилфенол	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	неизпитан	NEG	Фенол	Междинен химикал
10	Ресвератрол	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	да бъде	NEG	Въглеродород	Природен продукт

									отрицателно*		(цикличен)	

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS; M = моларна; IC₅₀ = половината от максималната предизвикваща потискане концентрация на изпитваното вещество; NEG = отрицателен; PN = приема се за отрицателен; POS = положителен.

* класифицира се като отрицателно, съгласно прегледа на литературата (2).

^aОбикновени вещества, изпитани чрез изследванията STTA и VM7Luc ER TA, които са определени като антагонисти на ER или ER-отрицателни и се използват за оценяване на точността в рамките на изследването за валидиране VM7Luc ER TA (2) (3).

¹ Валидационният доклад за изследване за транскрипционна активация (TA) чрез стабилно трансфектиране с цел откриване на ER-медирана активност, Част Б (2)

² Доклад за оценяване на метод за изпитване на ICCVAM относно метода за изпитване LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* метод за откриване на агонисти и антагонисти на ER (3).

³ Средните стойности за IC₅₀ бяха изчислени с помощта на стойностите, докладвани от лабораториите при изследването за валидиране VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM и Hiyoshi) (3).

⁴Докладваните концентрации бяха най-високите изпитани такива (за определяне на обхвата) по време на валидирането на изследването VM7Luc ER TA. В случай, че концентрациите се различават между отделните лаборатории, докладвана е най-високата концентрация. Вж. таблица 4-11 от Протокола за оценка на метода за изпитване на ICCVAM; Методът LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): *In Vitro* изследване за идентифициране на агонистично и антагонистично действие на химикали върху човешки естрогенен рецептор (3).

⁵Класифицирането като агонист на ER или като отрицателно вещество е въз основа на информацията в документите за контекстуален преглед (BRD) на ICCVAM за свързване на ER и методите за изпитване за TA (31), както и на информацията, получена от публикуваните и прегледани данни след завършване на BRD документите на ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Веществата бяха причислени към един или повече химични класове, като се използва системата MeSH на Националната библиотека по медицина на САЩ, международно призната стандартизирана схема за класификация (налична на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Веществата бяха причислени към един или повече продуктови класове, като се използва Базата данни на опасните вещества на Националната библиотека по медицина на САЩ (налична на адрес: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Критерии за приемливост на изпитвателната серия

16. Приемането или отхвърлянето на изпитвателната серия се прави на базата на оценката на резултатите, получени за референтните еталони и използваните контроли за всеки експеримент. Стойностите за PC₅₀ (EC₅₀) или IC₅₀ за референтните еталони следва да отговарят на критериите за приемливост, предвидени за избраното изследване (за STTA вж. допълнение 2, за VM7Luc ER TA вж. допълнение 3), като всички положителни/отрицателни контроли следва да бъдат правилно класифицирани за всеки приет експеримент. Способността за последователно изпълнение на изследването следва да бъде доказана чрез разработката и поддържането на база данни от предходни периоди относно референтните еталони и контроли (вж. точка 15). Стандартните отклонения (SD) или коефициентите на вариация (CV) за параметрите за изглаждане на кривата на референтните еталони от множество експерименти могат да бъдат използвани като мярка за вътрешнолабораторната възпроизводимост. Допълнително следва да бъдат изпълнени следните принципи относно критериите за приемливост:

- Данните следва да бъдат достатъчни за количествената оценка на активирането на ER (за изследването с агонисти) или подтискането им (за изследването с антагонисти) (т.е. ефикасност и сила).
- За да се осигури адекватна чувствителност, средната активност на репортерните гени за референтните концентрации на референтния естроген следва да бъде най-малко минималната специфицирана в изследванията по отношение на тази на контрола на носителя (разтворителя). За изследванията STTA и VM7Luc ER TA, тя е четири пъти тази на средната контрола на носителя на всяка плака.
- Изпитваните концентрации следва да останат в рамките на обхвата на разтворимост на изпитваните химикали и да не демонстрират цитотоксичност.

Анализ на данните

17. За класифициране на положителния и отрицателния отклик следва да се използва дефинираната процедура за интерпретиране на данни за всяко изследване.
18. Изпълнението на критериите за приемливост (точка 16) показва, че изследването работи правилно, но не гарантира, че конкретна изпитвателна серия ще даде точни данни. Повторението на резултатите от първата серия е най-доброто указание, че се получават точни данни. Ако две серии дадат възпроизводими резултати (напр. резултатите от двете изпитвателни серии покажат, че изпитвания химикал е положителен), не е необходимо да се провежда трета серия.
19. Ако две серии не дадат възпроизводими резултати (напр. изпитваният химикал е положителен при едната серия и отрицателен при другата) или ако се изисква висока степен на достоверност относно окончателния резултат от това изследване,

следва да се проведат най-малко три независими серии. В този случай, класификацията се базира на двата сходни резултата от трите получени.

Общи критерии за тълкуване на данните

20. Понастоящем не съществува универсално съгласуван метод за тълкуване на данните за ER TA. Въпреки това качествените (напр. положителен/отрицателен) и/или количествените (напр. EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) оценки на ER-медираната активност следва да бъдат базирани на емпирични данни и разумна научна преценка. Когато е възможно, положителните резултати следва да се характеризират както по големина на ефекта в сравнение с контролата на носителя (разтворителя) така и от референтния естроген и концентрацията, при която възниква ефектът (напр. EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ и др.).

Протокол от изпитването

21. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изследване:

- Използвано изследване;
- Контрол/референтен еталон/изпитван химикал
- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител/носител:

- характеристики (естество, доставчик и партида);

- обосновка за избора на разтворител/носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;

Клетки:

- тип и източник на клетките:
 - Експресира ли се ER ендегенно? Ако не, кой(кои) рецептор(и) са трансфектирани?
 - Използван(и) репортерен(-ни) модел(и) (включително биологичния вид на източника);
 - Метод на трансфектиране;
 - Метод за избор за поддържане на стабилно трансфектиране (когато е приложимо);
 - Методът на трансфектиране относим ли е за стабилните клетъчни линии?
- брой на клетъчните преминавания (от топене);
- номер на пасажа на клетките при размразяване;
- методи за поддържане на клетъчните култури;

Условия на изпитването:

- ограничения на разтворимостта;
- описание на приложените методи за оценяване на жизнеспособността;
- състав на средите, концентрация на CO₂;
- концентрации на изпитвания химикал;
- обем на носителя и добавения изпитван химикал;
- температура на инкубация и влажност;
- времетраене на третирането;
- клетъчна плътност в началото и по време на третирането;
- референтни еталони за положителни и отрицателни вещества;
- репортерни реагенти (наименование на продукта, доставчик и партида);
- критерии за обявяване на изпитвателните серии за положителни, отрицателни или неясни;

Проверка за приемливост:

- кратностите на индукциите за всяка плака от изследването и дали отговарят на минималните изисквания за изследването, на базата на контролите от предходни периоди;
- реални стойности за критериите за приемливост, напр. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ и стойности на HILLSLOPE за паралелните положителни контроли/референтни еталони;

Резултати:

- Необработени и нормализирани данни;
- максимално ниво на кратност на индукцията;
- данни за цитотоксичността;
- ако съществува, най-ниската ефективна концентрация (LEC);
- стойности на RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} и/или EC_{50} , в зависимост от конкретния случай;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- статистически анализи, ако има, заедно с мярката за грешка и достоверност (напр. SEM, SD, CV или 95% CI) и описание на начина за получаване на тези стойности;

Обсъждане на резултатите

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

(6) Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СЪКРАЩЕНИЯ

Критерии за приемливост: минималните стандарти за ефективност на експерименталните контроли и референтните еталони. Всички критерии за приемливост следва да бъдат изпълнени, за да може даден експеримент да се разглежда като валиден.

Точност (съответствие): степента на близост между резултатите от изследването и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на изследването и един от аспектите на неговата относимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при дадено изследване (1).

Агонист: Вещество, които предизвиква отклик, напр. транскрипция, когато се свързва със специфичен рецептор.

Антагонист: Тип рецепторен лиганд или химикал, който не провокира биологичен отклик сам по себе си при свързване с даден рецептор, но блокира или смекчава откликите, медириани от агониста.

Анти-естрогенна активност, способността на даден химикал да потиска действието на 17 β -естрадиол, медиран чрез естрогенните рецептори.

Клетъчна морфология: Формата и външният вид на клетките, отглеждани в един слой на единична ямка на плака с тъканна култура. Клетките, които умират, често пъти проявяват аномална клетъчна морфология.

СФ: Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценяване на вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система.

Третиране с въглен/декстран: Третиране на серума, използван в клетъчната култура. Третирането с въглен/декстран (често наричано “оголване”) премахва ендогенните хормони и хормон-свързващи протеини.

Химикал: Вещество или смес.

Цитотоксичност: Вредното въздействие върху клетъчната структура или функция, което в крайна сметка е в състояние да причини клетъчна смърт и се отразява чрез намаляване на броя на клетките, налични в ямката в края на периода на експозиция или намаляване на капацитета за измерване на клетъчната функция в сравнение с паралелната контрола на носителя.

CV: Коефициент на вариация

DCC-FBS: Фетален волски серум, обработен с въглен, покрит с декстран.

DMEM: Модифицирана Йигъл среда на Дюлбеко

DMSO: Диметилсулфоксид

E2: 17 β -естрадиол

EC₅₀: Половината от максимално ефективната концентрация на изпитвания химикал.

ED: Ендокринни нарушения

hER α : Човешки естрогенен рецептор алфа

hER β : Човешки естрогенен рецептор бета

EFM: Среда без естроген. Модифицирана от Дюлбеко среда на Йигъл (DMEM), допълнена с 4,5% FBS, третиран с въглен/декстран, 1,9% L-глутамин и 0,9% Pen-Strep (пеницилин-стрептомицин).

ER: Естрогенен рецептор

ERE: Елемент на естрогенния отклик

Естрогенна активност: Способността на даден химикал да наподобява 17 β -естрадиол в способността му за свързване с естрогенни рецептори и активирането им. hER α -медираната естрогенна активност може да се открие с помощта на този метод за изпитване.

ERTA: Трансактивация на естрогенен рецептор

FBS: Фетален волски серум

HeLa: Човешка безсмъртна цервикална клетъчна линия

HeLa9903: HeLa клетъчен субклон, в който стабилно се трансфектира hER α и луцифераза репортерен ген

IC₅₀: половината от максимално ефективната предизвикваща потискане концентрация на изпитван химикал.

ICCVAM: междуведомствен координационен комитет за валидиране на алтернативни методи.

Междулабораторна възпроизводимост: мярка за степента, в която различните квалифицирани лаборатории могат да получат качествено и количествено сходни резултати, като използват един и същ протокол и изпитват едни и същи вещества. Междулабораторната възпроизводимост се определя по време на предвалидационните и

валидационните процедури и указва степента, в която дадено изследване може успешно да бъде прехвърлено между различни лаборатории, наричана също интерлабораторна възпроизводимост (1).

Вътрешнолабораторна възпроизводимост: определяне на степента, в която квалифицирани служители в рамките на една и съща лаборатория могат да възпроизведат успешно резултатите, като използват конкретен протокол в различни моменти. Нарича се също „интралабораторна възпроизводимост“ (1).

LEC: Най-ниската ефективна концентрация е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, която предизвиква отклик (т.е. най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която кратността на индукцията е статистически различна от паралелната контрола на носителя).

Вариантен метод за изпитване (me-too test): Разговорен израз за изследване, който е структурно и функционално сходен с валидиран и приет референтен метод за изпитване. Използва се взаимозаменяемо със „сходен метод за изпитване“.

MT: Металотионеин

MMTV: Миши вирус на тумор на млечната жлеза

ОНТ: 4-Хидрокситамоксифен

PBTG: Насоки за изпитване, базирани на ефективност

РС (положителна контрола): силно активно вещество, за предпочитане 17 β -естрадиол, което е включено във всички изпитвания, за да гарантира правилното функциониране на изследването.

РС₁₀: концентрацията на изпитван химикал, при която измерената активност в изследване с агонист е 10% от максималната активност, индуцирана от ПК (Е2 при 1nM за STTA изследването) във всяка плака.

РС₅₀: концентрацията на изпитван химикал, при която измерената активност в изследване с агонист е 50% от максималната активност, индуцирана от ПК (Е2 при референтната концентрация, посочена в метода на изпитване) във всяка плака.

РС_{Max}: концентрацията на изпитван химикал, включително стойността РС_{Max}

Стандарти за ефективност: Стандарти, базирани на валидирано изследване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложено изследване, което е по своя механизъм и функционално сходно. Включени са (1) съществени компоненти на изследването; (2) минимален списък на референтни химикали, подбрани измежду химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и (3) сравнимите нива за точност и надеждност въз основа на получените нива за валидирания метод на изпитване, които предложеното изследване

следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (1).

Вещества за изследване за пригодност: Подмножество от референтни вещества, включени в Стандартите за ефективност, които може да се използват от лабораториите за доказване на техническа пригодност по отношение на стандартизиран метод за изпитване. Критериите за подбор на тези вещества обикновено включват изискването те да представляват обхвата от отговори, да се предлагат в търговската мрежа и да имат налични висококачествени референтни данни.

Пригодност: Доказаната способност за правилно провеждане на изследване преди изпитване на неизвестни вещества.

Референтен естроген (положителна контрола, ПК): 17 β -естрадиол (E2, CAS 50-28-2).

Референтен еталон: референтно вещество, използвано за доказване на адекватността на изследване. 17 β -естрадиолът е референтният еталон за изследванията STTA и VM7Luc ER TA.

Референтни методи на изпитване: Изследванията, на които е базиран PBTG 455.

Относителност: описание на взаимовръзката между изследването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изследването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Приложимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на изследването (1).

Надеждност: мярка за степента, в която дадено изследване може да се проведе възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории с течение на времето, при използване на един и същ протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост.

RLU: Относителни светлинни единици

РНК: Рибонуклеинова киселина

RPC_{max}: максималното ниво на отклик, предизвикан от изпитван химикал, изразено като процентно съотношение на отклика, предизвикан от 1 nM E2 върху същата плака

RPMI: Среда RPMI 1640, допълнена с 0,9% Pen-Strep и 8,0% фетален волски серум (FBS)

Серия: Индивидуален експеримент, който оценява химичното действие върху биологичния резултат от изследването. Всяка серия е пълен експеримент, извършен върху ямки с клетки за повторения върху плака, от общ сбор от клетки по едно и също време.

Независима серия: Отделен, независим експеримент, който оценява химично действие върху биологичния резултат от изследването, използвайки клетки от различен сбор, пряко

разредени химикали, проведен в различни дни или в същия ден от различен персонал.

SD: Стандартно отклонение.

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни вещества, които са класифицирани правилно чрез изследването. Това е мярка за точността на изследването, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на изследване (1).

Специфичност: Относителният дял от всички негативни/неактивни вещества, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изследването, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на изследване (1).

Стабилна трансфекция: Когато ДНК се трансфектира в култивирани клетки по такъв начин, че се интегрира устойчиво в клетъчния геном, което води до стабилна експресия на трансфектирани гени. Клонингите на стабилно трансфектирани клетки се избират по стабилни маркери (напр. устойчивост на G418).

STTA изследване: Изследване за трансактивация чрез стабилна трансфекция, изследването за транскрипционна активация на ER α , използващо клетъчната линия HeLa 9903.

Проучване: Пълният обхват от експериментална работа, извършена за оценяване на едно специфично вещество, с използване на специфично изследване. Проучването обхваща всички стъпки, включващи изпитвания на разредено изпитвано вещество в изпитваната среда, предварителни серии за определяне на обхватите, всички необходими всеобхватни серии, анализи на данни, осигуряване на качество, оценки на цитотоксичността и др. Приключването на проучване позволява класифициране на действието на изпитвания химикал върху целта на токсичността (т.е. активно, неактивно или не убедително), което се оценява от използваното изследване и от оценката на силата на действие във връзка с положителния референтен химикал.

Вещество: Съгласно REACH¹², веществото се дефинира като химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността му, както и всички

¹² Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕИО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕИО на Съвета и директиви 91/155/ЕИО, 93/67/ЕИО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията (ОВ L 304, 22.11.2007 г., стр. 1).

примеси, извлечени от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговия състав. Много подобно определение е използвано в контекста на GHS на ООН (1).

ТА (трансактивация): Инициирането на синтеза на иРНК в отговор на специфичен химичен сигнал, като например свързването на естроген с естрогенен рецептор

Изследване: В рамките на контекста на настоящия метод за изпитване, изследване е една от методиките, приети за валидни поради това, че изпълняват очертаните критерии за ефективност. Компонентите на изследване включват например, специфичната клетъчна линия с асоциираните условия на растеж, специфична среда, в която се провежда изпитването, условията на постановката с плаки, подредба и разреждане на изпитваните химикали, заедно с някои други необходими мерки за контрол на качеството и свързаните стъпки за оценка на данните.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Транскрипция: синтеза на иРНК

UVCB: Химични вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции и биологични материали.

Валидиран метод за изпитване: изследване, за което са извършени изследването за валидиране за определяне на приложимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод на изпитване може да не притежава достатъчно ефективност по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приемлив за предлаганата цел (1).

Валидиране: Процесът, чрез който надеждността и относимостта на конкретен подход, метод, изследване, процес или оценка се установяват за определена цел (1).

VC (контрол на носителя): Разтворителят, който се използва за разтваряне на изпитваните и контролните химикали се изпитва самостоятелно като носител, без разтворения химикал.

VM7: Имортиализирана клетка на аденокарцином, която експресира ендогенно естрогенен рецептор.

VM7Luc4E2: Клетъчната линия VM7Luc4E2 е извлечена от VM7 имортиализирани клетки на аденокарцином с човешки произход, които експресират ендогенно и двете форми на естрогенния рецептор (ER α и ER β) и са устойчиво трансфектирани с плазмида pGudLuc7.ERE. Този плазмид съдържа четири копия на синтетичен олигонуклеотид, съдържащ елемента на естрогенния отклик, предшестваш вирусния промотор на миши тумор на млечната жлеза (MMTV), и гена на луцифераза на светулка.

Слаба положителна контрола: Слабо активно вещество, избрано от списъка на референтните химикали, което е включено във всички изпитвания, за да гарантира правилното функциониране на изследването.

Допълнение 2

ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТРАНСАКТИВАЦИЯ ЧРЕЗ СТАБИЛНО ТРАНСФЕКТИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР-А, С ЦЕЛ ОТКРИВАНЕ НА АКТИВНОСТ НА ЕСТРОГЕННИ АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ НА ХИМИКАЛИ, С ИЗПОЛЗВАНЕ НА КЛЕТЪЧНАТА ЛИНИЯ hER α -HeLa-9903

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ (ВЖ. СЪЩО ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ)

1. Настоящото изследване за трансактивация (ТА) използва клетъчната линия hER α -HeLa-9903 за откриване на активност на естрогенен агонист, медирана от човешки естрогенен рецептор алфа (hER α). Изследването за валидиране на изследването за трансактивация чрез стабилно трансфектиране (STTA), проведено от Японския изследователски институт за оценка на химикали (CERI) с използване на клетъчната линия hER α -HeLa-9903 за откриване на активност на агонисти и антагонисти, медирана от човешки естрогенен рецептор алфа (hER α) доказва относимостта и надеждността на изследването за предвидената му цел (1).
2. Това изследване е специално разработено за откриване hER α -медирана ТА чрез измерване на хемилуминесцентността като крайната точка. Въпреки това бяха докладвани луминесцентни сигнали, които не са медирани от рецептори при концентрации на фитоестроген, по-високи от 1 μ M, и се дължат на свръхактивирането на луциферазния репортерен ген (2) (3). Тъй като кривата доза-отклик показва, че истинската активация на системата на ER възниква при по-ниски концентрации, експресията на луцифераза, получена при високи концентрации на фитоестрогени или подобни съединения, за които се подозира, че подобно на фитоестрогена предизвикват свръхактивация на луциферазния репортерен ген, трябва да се изследва внимателно в системи за изследване на ER ТА чрез стабилно трансфектиране (допълнение 1).
3. Разделите „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“ и „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ER ТА“ следва да бъдат прочетени, преди да се използва настоящото изследване за регулаторни цели. Използваните определения и съкращения в рамките на настоящите TG са описани в допълнение 2.1.

ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

4. Изследването се използва за сигнализиране на свързването на естрогенния рецептор с лиганд. След свързването с лиганда, комплексът рецептор-лиганд се транслоцира в ядрото, където свързва специфични елементи на ДНК отклик и трансактивира луциферазния репортерен ген на светулка, което води до повишена клетъчна експресия на ензима луцифераза. Луциферинът е субстрат, който се трансформира от ензима

луцифераза в биолуминесцентен продукт, който може да бъде количествено измерен с помощта на луцинометър. Луциферазната активност може да бъде измерена бързо и евтино с множество тестови китове, налични в търговската мрежа.

5. Системата за изпитване използва клетъчната линия hER α -HeLa-9903, която е получена от човешки цервикален тумор, с два стабилно вмъкнати конструкта: i) конструктът за експресия на hER α (кодиращ пълната дължина на човешкия рецептор), и ii) луциферазния репортерен конструкт от светулка, носител на пет тандемни повторения на елемент на естрогенен отклик (ERE) с вителогенин, управляван от миши металотионеин (MT) промоторен TATA елемент. Мишият MT TATA генен конструкт е с доказана най-добра ефективност и поради това се използва често. Вследствие на това, настоящата клетъчна линия hER α -HeLa-9903 може да измери способността на изпитвания химикал да индуцира hER α -медирана трансактивация на експресията на луциферазния ген.
6. Когато се провежда изследване с агонисти на ER, тълкуването на данните се базира на това дали максималното ниво на отклик, предизвикано от изпитвания химикал, е равно или превишава отклика на агониста, равен на 10% от предизвикания от максимално предизвикващата отклик (1 nM) концентрация на положителната контрола (ПК) 17 β -естрадиол (E2) (т.е. стойността ПК₁₀). Когато се провежда изследване с антагонисти на ER, тълкуването на данните се базира на това дали откликът показва най-малко 30% намаление на активността спрямо отклика, предизвикан от контрола с добавка (25 pM E2) без цитотоксичност. Анализът и тълкуването на данните са обсъдени подробно в точки 34 - 48.

ПРОЦЕДУРА

Клетъчни линии

7. За изследването следва да се използва стабилно трансфектираната клетъчна линия hER α -HeLa-9903. Клетъчната линия може да се получи от клетъчната банка на Японската колекция от биоресурси за изследователски цели (JCRB)¹³, след подписване на Договор за предаване на материал (MTA).

¹³ Клетъчна банка на JCRB : Национален институт по биомедицински иновации, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Япония, факс: +81-72-641-9812

8. Единствено клетки, характеризиращи се с липса на микоплазма следва да бъдат използвани за изпитванията. Избраният чувствителен метод за откриване на инфекции с микоплазма е RT-PCR (полимеразната верижна реакция в реално време) (4) (5) (6).

Стабилност на клетъчната линия

9. За наблюдение на стабилността на клетъчната линия следва да се използват E2, 17 α -естрадиол, 17 α -метилтестостерон и кортикостерон като референтни еталони за изследването с агонисти, като поне веднъж при всяко изпълнение на изследването следва да се измерват стойностите за съставяне на пълна крива концентрация-отклик в рамките на обхвата на концентрацията на изпитването, посочен в таблица 1, а получените резултати следва да съответстват на резултатите, посочени в таблица 1.
10. В случай на изследване с антагонисти, стойностите за съставяне на пълни графики за двата референтни еталона, тамоксифен и флутамид, следва да бъдат измервани едновременно с всяка серия. Трябва да се следи за правилната качествена класификация за двата химикала като положителен или отрицателен.

Клетъчна култура и условия на плаките за изследване

11. Клетките следва да бъдат отглеждани в минималната есенциална среда на Eagle (EMEM) без фенолно червено, с добавка от 60 mg/l антибиотик канамицин и 10% фетален волски серум с покритие от декстран и третиран въглен (DCC-FBS), в инкубатор с CO₂ (5% CO₂) при температура 37 $\pm$ 1°C. При достигане на 75 -90% конfluентност, клетките могат бъдат субкултивирани в съотношение 10 ml от 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ клетки/ml за 100 mm съд за клетъчни култури. Клетките следва да бъдат суспендирани с 10% FBS-EMEM (който е същия като при EMEM с DCC-FBS) и след това разпределени в ямките на микроплака при плътност от 1 x 10⁴ клетки/(100 μ l x ямка). След това, клетките следва да бъдат предварително инкубирани в инкубатор с 5% CO₂ при 37 $\pm$ 1°C за 3 часа, преди експозиция на химикала. Пластмасовите съдове и пособия следва да нямат естрогенна активност.
12. За да се поддържа цялостта на отклика, клетките следва да бъдат отглеждани за повече от един пасаж от замразения запас в кондиционираната среда и не следва да бъдат култивирани за повече от 40 пасажа. За клетъчната линия hER α -HeLa-9903, това е по-малко от три месеца. Въпреки това, ефективността на клетките може да бъде намалена, ако бъдат отглеждани в неподходящи условия за култивиране.
13. DCC-FBS може да бъде приготвен, както е описано в допълнение 2.2 или да бъде набавен от източници от търговската мрежа.

Критерии за приемливост

Референтни еталони за положителни и отрицателни вещества, за изследването с агонисти

на ER

14. Преди и по време на проучването следва да се провери способността за реагиране на изпитваната система като се използват подходящи концентрации на силен естроген: E2, слаб естроген (17 α -естрадиол), много слаб агонист (17 α -метилтестостерон), и отрицателно вещество (кортикостерон). Стойностите на приемливия обхват, получени от изследването за валидиране (1), са дадени в таблица 1. Тези 4 паралелни референтни еталона следва да бъдат включени във всеки експеримент и резултатите следва да попадат в рамките на дадените приемливи граници. В противен случай следва да бъде установена причината за неизпълнението на критериите за приемливост (напр. манипулиране на клетките, серума и антибиотиците с цел постигане на качество и концентрация), а изследването следва да бъде повторено. След като бъдат постигнати критериите за приемливост, за да се гарантира максимална изменчивост на стойностите за EC₅₀, PC₅₀ и PC₁₀, от съществено значение е последователното използване на материалите за клетъчно култивиране. Четирите паралелни референтни еталона, които следва да бъдат включени във всеки експеримент (провеждан при същите условия, включително по отношение на материалите, нивото на пасаж на клетките, лабораторните техники), могат да осигурят чувствителността на изследването, защото стойностите за PC₁₀ на трите положителни референтни еталона следва да попадат в рамките на приемливия обхват, както и тези за PC₅₀ и EC₅₀, когато могат да се изчислят такива (вж. таблица 1).

Таблица 1: Приемлив обхват на стойностите за четирите референтни еталона за изследването с агонисти на ER

Наименование	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Крива на Хил	Обхват на изпитването
17 β -естрадиол (E2) CAS №: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ М
17 α -естрадиол CAS №: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ М
Химикал CAS №: 50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ М
17 α -метилтестостерон CAS №: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ М

Референтни еталони за положителни и отрицателни вещества за изследването с антагонисти на ER

15. Преди и по време на проучването следва да се провери способността за реагиране на изпитваната система, като се използват подходящи концентрации на положително вещество (тамоксифен) и отрицателно вещество (флутамид). Стойностите на приемливия обхват, получени от изследването за валидиране (1), са дадени в таблица 2. Тези два паралелни референтни еталона следва да бъдат включени във всеки експеримент и резултатите следва да бъдат правилно преценявани, както е показано в

критериите. В противен случай следва да бъде установена причината за неизпълнението на критериите (напр. манипулиране на клетките, серума и антибиотиците с цел постигане на качество и концентрация), а изследването следва да бъде повторено. В допълнение трябва да се изчислят стойностите за IC₅₀ за положително вещество (тамоксифен) и резултатите следва да попадат в рамките на дадените приемливи граници. След като бъдат постигнати критериите за приемливост, за да се гарантира максимална изменчивост на стойностите за IC₅₀, от съществено значение е последователното използване на материалите за клетъчно култивиране. Двата паралелни референтни еталона, които следва да бъдат включени във всеки експеримент (провеждан при същите условия, включително по отношение на материалите, нивото на пасаж на клетките, лабораторните техники), могат да осигурят чувствителността на изследването (вж. таблица 2).

Таблица 2: Критерии и стойности на приемливия обхват на двата референтни еталона за изследването с антагонисти на ER

Наименование	К р и т е р и и	LogIC ₅₀	Обхват на изпитването
Тамоксифен CAS №: 10540-29-1	п о л о ж и т е л е н : IC ₅₀ следва да се изчисли	-5,942~-7,596	10-10~10-5M
Флутамид CAS №: 13311-84-7	о т р и ц а т е л е н : IC ₃₀ не следва да се изчислява	-	10-10 ~10-5M

Контроли на положителното вещество и носителя

16. Положителната контрола (ПК) за изследването с агонисти на ER (1 nM E2) и за изследването с антагонисти на ER (10µM TAM) следва да бъдат изпитвани най-малко три пъти във всяка плака. Носителят, който се използва за разтваряне на изпитвания химикал, следва да бъде изпитан като контрола на носителя (VC) най-малко три пъти във всяка плака. В допълнение към тази контрола на носителя (VC), ако ПК използва различен носител от изпитвания химикал, следва да се изпита друга VC най-малко три пъти в същата плака с ПК.

Критерии за качество за изследването с агонисти на ER

17. Средната луциферазна активност на положителната контрола (1 nM E2) следва да бъде най-малко 4-кратно по-голяма от средната VC за всяка плака. Този критерий е установен на базата на надеждността на стойностите за крайните точки от изследването за валидиране (по данни от предходни периоди между четири и 30 пъти).
18. По отношение на контрола на качеството на изследването, кратността на индукцията, отговаряща на стойността за PC₁₀ на паралелната ПК (1 nM E2), следва да бъде по-голяма от 1+2SD от стойността на кратността на индукцията (=1) на паралелната VC. С цел определяне на приоритети, стойността PC₁₀ може да бъде полезна за опростяване на

необходимия анализ на данните в сравнение със статистическия анализ. Въпреки че статистическият анализ предоставя информация за значимостта, този анализ не е количествен параметър по отношение на потенциала на базата на концентрацията и поради това е по-малко полезен за целите на определяне на приоритети.

Критерии за качество за изследването с антагонисти на ER

19. Средната луциферазна активност на контрола с добавка (25 pM E2) следва да бъде най-малко 4-кратно по-голяма от средната VC за всяка плака. Този критерий е установен на базата на надеждността на стойностите за крайните точки от изследването за валидиране.
20. По отношение на контрола на качеството на изследването, относителното активиране на транскрипцията (RTA) на 1 nM E2 следва да бъде повече от 100%, RTA на 1 μM 4-хидрокситамоксифен(ОНТ) следва да бъде по-малко от 40,6%, а RTA на 100 μM дигитонин (Dig) следва да бъде по-малко от 0%.

Доказване на пригодността *на лабораторията* (вж. точка 14 и таблици 3 и 4 в «КОМПОНЕНТИ НА ER ТА ИЗСЛЕДВАНЕТО» от настоящия метод за изпитване).

Превозно средство

21. В качеството си на паралелна контрола на носителя (VC) следва да бъде използван диметил сулфоксид (DMSO) или подходящ разтворител с концентрацията, използвана за различните положителни и отрицателни контроли и за изпитваните химикали. Изпитваните химикали следва да бъдат разтваряни в разтворител, който разтваря конкретния изпитван химикал и се смесва с клетъчната среда. Подходящи носители са вода, етанол (с чистота 95% до 100%) и DMSO. Ако се използва DMSO, нивото не следва да превишава 0,1% (v/v). За всеки носител следва да се докаже, че максималният използван обем не е цитотоксичен и не оказва отрицателно влияние върху ефективността на изследването.

Приготвяне на изпитваните химикали

22. По принцип изпитваните химикали следва да бъдат разтваряни в DMSO или друг подходящ разтворител и последователно разреждани със същия разтворител в обичайно използваното съотношение от 1:10 за приготвяне на разтвори за разреждане със среда.

Разтворимост и цитотоксичност: Съображение при определянето на обхвата.

23. Следва да се проведе предварително изпитване за определяне на подходящия обхват на концентрацията на химикала, който ще бъде изпитван и за констатиране дали изпитваният химикал има вероятност да има проблеми с разтворимостта и цитотоксичността. Първоначално химикалите се изпитват до максимална концентрация от 1 μl/ml, 1 mg/ml или 1 mM, която от тези стойности е най-ниска. Въз основата на

степената на цитотоксичност или на липсата на разтворимост, наблюдавани по време на предварителното изпитване, първата окончателна серия следва да изпитва химикала при логаритмични последователни разреждания, като се започне от максималната приемлива концентрация (напр. 1 mM, 100 μM, 10 μM и т.н.) като наличието на помътняване, преципитат или цитотоксичност следва да бъде отбелязвано. Концентрациите във втората и, ако е необходимо, в третата серия следва да бъдат коригирани, според случая с оглед по-добро характеризиране на кривата концентрация-отклик и недопускане на концентрации, за които е установено, че са неразтворими или предизвикват прекомерна цитотоксичност.

24. При агонистите и антагонистите на ER, наличието на повишаващи се нива на цитотоксичност може значително да промени или да елиминира типичния сигмоидален отклик и следва да се вземе предвид при тълкуването на данните. Следва да се използват методи за изпитване на цитотоксичността, които могат да предоставят информация за 80% клетъчна жизнеспособност, с помощта на подходящо изследване, базирано на лабораторния опит.
25. Ако резултатите от изпитването за цитотоксичност покажат, че концентрацията на изпитвания химикал е намалила броя на клетките с 20% или повече, тази концентрация следва да се разглежда като цитотоксична, а концентрациите, равни или над цитотоксичните концентрации, следва да бъдат изключвани от оценката.

Химическа експозиция и организация на плаката за изследването

26. Процедурата за разрежданията на химикала (Стъпки 1 и 2) и експозицията на клетките (Стъпка 3) могат да бъдат провеждани както следва:

Стъпка 1: Всеки изпитван химикал следва да бъде разреден последователно в DMSO, или друг подходящ разтворител и добавен към ямите на микротитърна плака до постигане на окончателните серийни концентрации, определени от предварителното изпитване за определяне на обхвата (обикновено в следните серии, например 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM и 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)) за тройно изпитване.

Стъпка 2: Разреждане на химикала: Първо се разрежда 1,5 μl от изпитвания химикал в разтворителя до концентрация 500 μl от средата.

Стъпка 3: Експозиция на химикала на клетките: Добавят се 50 μl от разрежения разтвор със средата (приготвени в Стъпка 2) към ямка за анализ, съдържаща 10^4 клетки/100 μl/ямка.

Препоръчителният окончателен обем на средата, необходима за всяка ямка е 150 μl. Изпитваните проби и референтните еталони могат да бъдат определени, както е показано в таблица 3 и таблица 4.

Таблица 3: Пример за определяне на концентрация на референтните еталони в плаката за анализ, като част от изследването с агонисти на ER

Ред	17α-метилтестостерон			Химикал			17α-эстрадиол			Е2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	конц. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
Б	конц. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
В	конц. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
Г	конц. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
Д	конц. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
Е	конц. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Ж	конц. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
З	VC	→	→	→	→	→	ПК	→	→	→	→	→

VC: Контрола на носителя (0,1% DMSO); ПК: положителна контрола (1 nM E2)

[illegible]

Таблица 4: Пример за определяне на концентрация на изпитваните химикали и химикалите за контрол в плаката за анализ, като част от изследването с антагонисти на ER

Ред	Изпитван химикал 1			Изпитван химикал 2			Изпитван химикал 3			Изпитван химикал 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	конц. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
Б	конц. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
В	конц. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
Г	конц. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
Д	конц. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
Е	конц. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Ж	конц. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
З	VC	→	→	→	→	→	ПК	→	→	→	→	→

VC: контрола на носителя (0,1% DMSO); ПК: положителна контрола (1 nM E2)

Таблица 5: Пример за определяне на концентрация на референтните еталони в плаката за анализ, като част от изследването с антагонисти на ER

Ред	Тамоксифен			Флутамид			Изпитван химикал 1			Изпитван химикал 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	конц. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
Б	конц. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
В	конц. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→

Г	конц. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
Д	конц. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
Е	конц. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
Ж	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM ОНТ	→	→	100 μM Dig	→	→
З	VC	→	→	→	→	→	ПК	→	→	→	→	→

VC: Контрола на носителя (0,1% DMSO), ПК: положителна контрола (1 nM E2), ОНТ: 4-Хидроикстамоксифен, Dig: Дигитонин.

 = с добавяне на 25pM E2

28. За да се оцени антагонистичната активност на химикали, към ямките за анализ, разположени на редове от А до Ж, се добавя 25pM E2. Референтните еталони (тамоксифен и флутамид) следва да бъдат изпитвани във всяка серия. Във всяка плака за анализ от изпитването следва да бъдат включени ямки с ПК, третирани с 1 nM E2, който може да бъде качествен контрол на клетъчната линия hER α -HeLa-9903, ямки с VC, третирани с DMSO (или подходящ разтворител), ямки с 0,1% DMSO, третирани с добавяне на DMSO към E2, съответстващи на „Контрола с добавка“, ямки, третирани с окончателна концентрация от 1 μM ОНТ, и ямки, третирани с 100 μM Dig (таблица 5). Плаката за следващото изследване трябва да бъде със същото разположение на ямките без ямките за референтните еталони (таблица 6). Когато клетки от различни източници (напр. различен номер на пасаж, различна партида и т.н.) се използват в рамките на един и същи експеримент, референтните еталони следва да бъдат изпитани за всеки клетъчен източник.

Таблица 6: Пример за определяне на концентрация на изпитваните химикали и химикалите за контрол в плаката за анализ, като част от изследването с антагонисти на ER

Ред	Изпитван химикал 1			Изпитван химикал 2			Изпитван химикал 3			Изпитван химикал 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	конц. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
Б	конц. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
В	конц. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
Г	конц. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
Д	конц. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
Е	конц. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
Ж	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM ОНТ	→	→	100 μM Dig	→	→
З	VC	→	→	→	→	→	ПК	→	→	→	→	→

VC: Контрола на носителя (0,1% DMSO), ПК: положителна контрола (1 nM E2), ОНТ: 4-Хидрокситамоксифен, Dig: Дигитонин.

 : С добавен 25pM E2

29. Следва да се потвърди отсъствието на гранични ефекти, ако е необходимо, а ако има подозрения за такива, разположението на ямките в плаката трябва да се промени, за да не се допуснат такива ефекти. Например, може да се използва плака с такова разпределение, което да изключва граничните ямки.
30. След добавяне на химикалите, плаките за анализ следва да бъдат инкубирани в инкубатор с 5% CO₂ при 37±1°C за 20-24 часа за индуциране на продуктите на репортерния ген.
31. По отношение на съединенията, които са силно летливи, трябва да се приложат специални съображения. В такива случаи, намиращите се в близост ямки с контроли могат да генерират фалшиви положителни резултати и това следва да се разглежда в светлината на очакваните и стойности на контролите от предходни контроли. В няколкото случая, в които летливостта може да бъде притеснителна, използването на „запечатващи филми за плаки“ може да помогне за ефективно изолиране на отделните ямки по време на изпитване, поради което се препоръчва в подобни случаи.
32. С цел осигуряване на независимост на резултатите, следва да бъдат проведени повторни окончателни изпитвания за същия химикал в различни дни.

Изследване за луцифераза

33. Наличният в търговската мрежа реагент за изследване на луцифераза [напр. Система за изследване на луцифераза Steady-Glo® (Promega, E2510 или еквивалентна)] или стандартна система за изследване на луцифераза (напр. Promega, E1500 или еквивалентна) могат да бъдат използвани за изследването при условие, че са изпълнени критериите за приемливост. Реагентите за изследването следва да бъдат избрани въз основа на чувствителността на използвания луминометър. При работа със стандартната система за изследване на луцифераза, преди добавяне на субстрата следва да се приложи лизиращ реагент за клетъчни култури (e.g. Promega, E1531 или еквивалентен). При прилагане на реагента луцифераза следва да се спазват инструкциите на производителя.

АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

Изследване с агонисти на ER

34. Когато се провежда изследване с агонисти на ER, за да се получи относителната транскрипционна активност по отношение на ПК (1 nM E2), луминесцентните сигнали от същата плака могат да бъдат анализирани чрез следните стъпки (приемливи са и други еквивалентни математически процедури):

Стъпка 1. Изчисляване на средната стойност за VC.

Стъпка 2. Изваждане на средната стойност на VC от стойността на всяка ямка за нормализиране на данните.

Стъпка 3. Изчисляване на средната стойност за нормализирания ПК.

Стъпка 4. Разделяне на нормализираната стойност на всяка ямка в плаката на средната стойност на нормализираната ПК (ПК=100%).

Окончателната стойност на всяка ямка е относителната транскрипционна активност за тази ямка, сравнена с отклика на ПК.

Стъпка 5. Изчисляване на средната стойност на относителната транскрипционна активност за всяка група по концентрация от изпитвания химикал. Съществуват две измерения на отклика: усреднената транскрипционна активност (отклик) и концентрацията, при която възниква откликът (вж. следващия раздел).

Съображения относно индукцията на EC₅₀, PC₅₀ и PC₁₀

35. За изчисляването на EC₅₀ е необходима цялата крива концентрация-отклик, но това може не винаги да бъде постижимо или приложимо на практика, поради ограниченията на обхвата на изпитваната концентрация (например, поради проблеми, свързани с цитотоксичност или разтворимост). Все пак, тъй като EC₅₀ и максималното ниво на индукция (съответстващо на максималната стойност на уравнението на Хил) са информативни параметри, те следва да бъдат отчитани, когато е възможно. За изчисляването на EC₅₀ и максималното ниво на индукция следва да се използва подходящ софтуер за статистически изчисления (напр. статистическия софтуер Graphpad Prism). Ако логистичното уравнение на Хил е приложимо за данните за отклика в зависимост от концентрацията, EC₅₀ следва да се изчислява съгласно следното уравнение (7):

$$Y = \text{Най-ниско ниво} + (\text{Най-високо ниво} - \text{Най-ниско ниво}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{крива на Хил})})$$
където:

X е логаритъмът от концентрацията; както и

Y е откликът, който започва в Най-ниското ниво и продължава до Най-високото ниво, следвайки сигмоидна крива. Най-ниското ниво е фиксирано на нула по логистичното уравнение на Хил.

36. За всеки изпитван химикал трябва да се посочи следното:

RPC_{Max}, което е максималното ниво на отклик, индуциран от изпитван химикал, изразено като процентно съотношение на отклика, индуциран от 1 nM E2 върху същата плака, както и PC_{Max} (концентрацията, свързана с RPC_{Max}); както и

За положителни химикали, концентрациите, които индуцират PC₁₀ и, ако е необходимо,

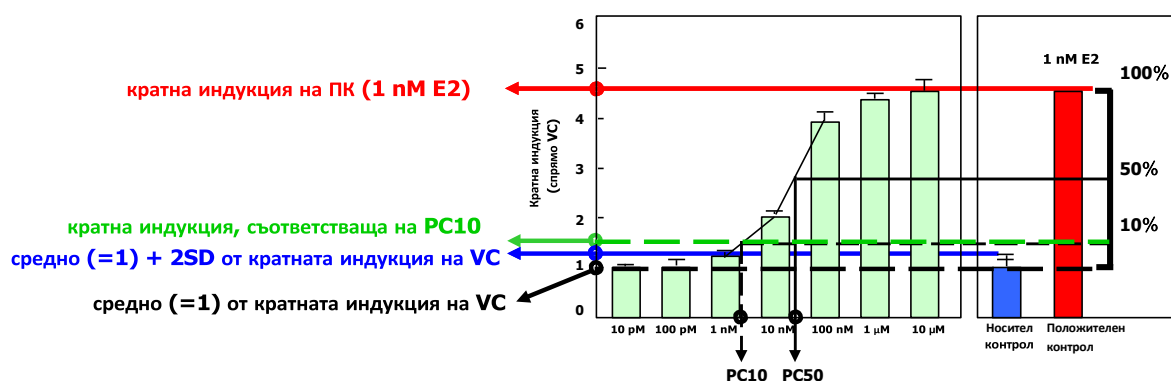
PC₅₀.

37. Стойността ПКх може да се изчисли чрез интерполиране между 2 точки по X-Y координатите, една непосредствено над и една непосредствено под дадена стойност на ПКх. Когато точките от данни, които лежат непосредствено над и под стойността на ПКх, са с координати съответно (a,b) и (c,d), тогава стойността на ПКх може да се изчисли с помощта на следното уравнение:

$$\log[\text{ПКх}] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Описание на стойностите на ПК е дадено на фигура 1 по-долу.

Фигура 1: Пример за начин за определяне на стойности на ПК. ПК (1 nM E2) се включва във всяка плака за анализ



Изследване с антагонисти на ER

39. Когато се провежда изследване с антагонисти на ER, за да се получи относителната транскрипционна активност (RTA) по отношение на контрола с добавка (25 pM E2), луминесцентните сигнали от същата плака могат да бъдат анализирани чрез следните стъпки (приемливи са и други еквивалентни математически процедури):

Стъпка 1. Изчисляване на средната стойност за VC.

Стъпка 2. Изваждане на средната стойност на VC от стойността на всяка ямка за нормализиране на данните. Стъпка 3. Изчисляване на средната стойност за нормализирания контрол с добавка.

Стъпка 4. Разделяне на нормализираната стойност на всяка ямка в плаката на средната стойност на нормализирания контрол с добавка (контрол с добавка=100%).

Окончателната стойност на всяка ямка е относителната транскрипционна активност за тази ямка, сравнена с отклика на контрола с добавка.

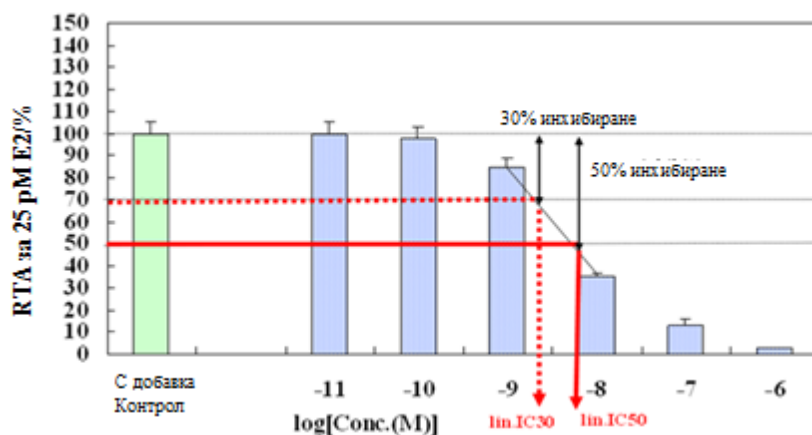
Стъпка 5. Изчисляване на средната стойност на относителната транскрипционна активност за всяко третиране.

Съображения относно индукцията на IC₃₀ и IC₅₀

40. За положителни химикали следва да бъдат посочени концентрациите, които индуцират IC₃₀ и, ако е необходимо, IC₅₀.
41. Стойността IC_x може да се изчисли чрез интерполиране между 2 точки по координатите X и Y, една непосредствено над и една непосредствено под дадена IC_x стойност. Когато точките от данни, които лежат непосредствено над и под стойността IC_x, са с координати съответно (a,b) и (c,d), тогава стойността IC_x може да се изчисли с помощта на следното уравнение:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Фигура 2: Пример за начин за определяне на IC стойности. Контролът с добавка (25 pM E2) се включва във всяка плака за анализ



RTA: относителна транскрипционна активност

42. Резултатите следва да се базират на две (или три) независими серии. Ако две серии дават сравними и следователно възпроизводими резултати, не е необходимо да се извършва трета серия. За да са приемливи, резултатите следва:

- да отговарят на критериите за приемливост (вж. точки 14-20 на критериите за приемливост),
- да са възпроизводими.

Критерии за тълкуване на данните

Таблица 7: Критерии за вземане положително или отрицателно решение в изследването с агонисти на ER

За положително решение	Ако получената стойност RPC_{Max} е равна или превишава 10% от отклика на положителната контрола в най-малко две от две или две от три серии.
За отрицателно решение	Ако стойността RPC_{Max} не достигне най-малко 10% от отклика на положителната контрола в две от две или две от три серии.

Таблица 8: Критерии за вземане на положително или отрицателно решение в изследването с антагонисти на ER

За положително решение	Ако стойността IC_{30} е изчислена в най-малко две от две или две от три серии.
За отрицателно решение	Ако стойността IC_{30} не може да бъде изчислена в най-малко две от две или две от три серии.

43. Критериите за тълкуване на данните са показани в таблици 7 и 8. Положителните резултати се характеризират както от големината на ефекта, така и от концентрацията, при която възниква този ефект. Изразяването на резултатите като концентрация, при

която 50% (PC50) или 10% (PC10) от стойностите на ПК са достигнати за изследването с агонисти и 50% (IC50) или 30% (IC30) от стойностите на контролата с добавка са потиснати за изследването с антагонисти, постига и двете цели. Въпреки това, изпитваният химикал се определя като положителен, ако максималният отклик, предизвикан от изпитвания химикал (RPCMax), е равен или превишава 10% от отклика на ПК в най-малко две от две или две от три серии, докато изпитваният химикал се разглежда като отрицателен, ако RPCMax не успее да достигне най-малко 10% от отклика на положителната контрола в две от две или две от три серии.

44. Изчисляването на PC₁₀, PC₅₀ и PC_{Max} в изследването с агонисти на ER и IC₃₀ и IC₅₀ в изследването с антагонисти на ER може да се направи с използване на електронната таблица, предлагана заедно с Насоките за изпитване на публичния уеб сайт на ОИСР¹.
45. Достатъчно би било да се получат стойностите за PC₁₀ или PC₅₀ и IC₃₀ или IC₅₀ най-малко два пъти. Все пак, ако получените базови стойности за данните в един същи обхват на концентрация показват изменчивост с неприемливо висок коефициент на вариация (CV; %) данните може да се разглеждат като ненадеждни и следва да се определи източникът на високия процент на изменчивост. CV на необработените данни от трикратното изпитване (т.е. данните за интензивността на луминесценцията) на точките с данни, които са използвани за изчисляването на PC₁₀, следва да бъде по-малък от 20%.
46. Изпълнението на критериите за приемливост показва, че системата за изследване функционира правилно, но не гарантира, че всяка конкретна серия ще даде точни данни. Дуплицирането на резултатите от първата серия е най-добрата гаранция, че се получават точни данни.
47. В случай на изследване с агонисти на ER, където се изисква повече информация в допълнение към целите на скрининга и определянето на приоритети на настоящите TG за положителни изпитвани химикали, и по-точно за химикалите PC10-PC49, както и за онези, за които има подозрения, че предизвикват свръхстимулация на луцифераза, може да се потвърди, че наблюдаваната луциферазна активност е единствено ER α -специфичен отклик, използващ ER α антагонист (вж. допълнение 2.1).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

48. Вж. параграф 20 на „КОМПОНЕНТИ НА АНАЛИЗА ЕР ТА“.

ЛИТЕРАТУРА

(7)

Допълнение 2.1

НЕВЕРНИ ПОЛОЖИТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ: ОЦЕНКА НА ЛУМИНЕСЦЕНТНИ СИГНАЛИ, НЕМЕДИИРАНИ ОТ РЕЦЕПТОРИ

1. Неверните положителни резултати в изследването с агонисти на ER може да бъдат генерирани от немедирана от ER активация на луциферазния ген или от директна активация на генния продукт, или друга, несвързана флуоресценция. За наличието на тези ефекти свидетелства непълна или необичайна крива доза-отклик. В случай на съмнение за подобни ефекти, трябва да се изследва ефектът на антагонистите на ER (напр. 4- хидрокситамоксифен (ОНТ) в нетоксична концентрация) върху отклика. Чистият антагонист ICI 182780 може да не бъде подходящ за тази цел, тъй като достатъчна концентрация на ICI 182780 може да намали стойността на VC, а това ще окаже влияние върху анализа на данните.
2. За да се осигури валидност на този подход, трябва да се извърши изпитване в същата плака на:
 - Агонистичната активност на неизвестен химикал с / без 10 μ M ОНТ
 - VC (трикратно)
 - ОНТ (трикратно)
 - 1 nM E2 (трикратно) като ПК за агонисти
 - 1 nM E2 + ОНТ (трикратно)

Критерии за тълкуване на данните

Забележка: Всички ямки следва да бъдат третираны със една и съща концентрация на носителя.

- Ако агонистичната активност на неизвестния химикал НЕ се повлияе от третирането с антагонист на ER, той се класифицира като “Отрицателен”.
- Ако агонистичната активност на неизвестния химикал е напълно потисната, следва да се приложат критериите за решение.
- Ако агонистичната активност при най-ниската концентрация е равна на отклика на PC_{10} или го превишава, неизвестният химикал е потиснат в степен, равна на отклика на PC_{10} , или по-голяма. Изчислява се разликата в отговорите на нетретираните и третираните ямки с антагонист на ER, като тази разлика следва да се разглежда като отклик и следва да се използва за изчисляването на подходящите параметри, които позволяват вземането на решение за класификация.

Анализ на данните

Проверка на стандарта за ефективност.

Проверка на CV за ямки, третирани при едни и същи условия.

1. Изчисляване на средната стойност на VC
2. Изваждане на средната стойност за VC от стойността на всяка ямка, **нетретирана** с ОНТ
3. Изчисляване на средната стойност на ОНТ
4. Изваждане на средната стойност за VC от стойността на всяка ямка, третирана с ОНТ
5. Изчисляване на средната стойност на ПК
6. Изчисляване на относителната транскрипционна активност на всички други ямки спрямо ПК.

Допълнение 2.2

ПРИГОТВЯНЕ НА СЕРУМ, ТРЕТИРАН С ВЪГЛЕН С ПОКРИТИЕ ОТ ДЕКСТРАН (DCC)

1. Третирането на серум с въглен с покритие от декстран (DCC) е общ метод за отстраняване на естрогенни съединения от серума, който се добавя към клетъчната среда, за да се изключи неверен отклик, свързан с наличието на остатъчни естрогени в серума. С тази процедура може да се третира 500 ml фетален волски серум (FBS).

Компоненти

2. Ще бъдат необходими следните материали и оборудване:

Материали

Активен въглен

Декстран

Магнезиев хлорид хексахидрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Захароза

1 M HEPES буферен разтвор (pH 7.4)

Ултрапречистена вода от филтърна система

Оборудване

Стерилизиран в автоклав стъклен съд (размерът следва да се коригира според необходимостта) Лабораторна центрофуга с общо предназначение (която може да поддържа температура от 4°C)

Процедура

3. Следната процедура се коригира за работа с епруветки за центрофугиране от 50 ml:

[Ден 1] Приготвя се суспензия на въглен с декстраново покритие с 1 l ултрапречистена вода, съдържаща 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M захароза, 2,5 g въглен, 0,25 g декстран и 5 mM HEPES и се разбърква при 4°C за една нощ.

[Ден 2] Разпределя се суспензията в епруветки за центрофугиране от 50 ml и се центрофугира със скорост от 10000 об./мин. при 4°C за 10 минути. Отстранява се супернатантът и се съхранява половината от въгленовия седимент при 4°C за употреба през Ден 3. Суспендира се другата половина от въглена с FBS, който е бил плавно размразен, за да не се допусне преципитация и топлинно деактивиран при 56°C за 30 минути, след което се прехвърля суспензията в стерилизиран в автоклав стъклен съд,

напр. елренмайерова колба. Разбърква се леко суспензията при 4°C цяла нощ.

[Ден 3] Суспензията с FBS се разпределя в епруветките и се центрофугира със скорост 10000 об./мин. при 4°C за 10 минути. Отстранява се FBS и се прехвърля в новия въгленов седимент, приготвен и съхранен през Ден 2. Суспендира се въгленовият седимент и се разбърква леко получената суспензия в стерилизиран в автоклав стъклен съд при 4°C за една нощ.

[Ден 4] Разпределя се суспензията за центрофугиране със скорост 10000 об./мин. при 4°C за 10 минути и се стерилизира супернатантът чрез филтриране през 0,2 µm стерилен филтър. Този третиран с DCC FBS следва да бъде съхраняван при -20°C може да се използва в период до една година.

ДОПЪЛНЕНИЕ 3

VM7LUC ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТРАНСАКТИВАЦИЯ НА ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ НА ЕСТРОГЕННИЯ РЕЦЕПТОР

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

1. Настоящото изследване използва клетъчната линия VM7Luc4E2¹. То е валидирано от Националната програма по токсикология към Междуведомствения център за оценка на алтернативни токсикологични методи (NICEATM) и Междуведомствения координационен комитет по валидиране на алтернативни методи (ICCVAM) (1). Клетъчните линии VM7Luc преобладаващо експресират ендogenous ER α и минимално количество ендogenous ER β (2) (3) (4).
2. Настоящото изследване е приложимо за широк обхват от вещества, при условие че те могат да бъдат разтворени в диметилсулфоксид (DMSO; CASRN 67-68-5), не реагират с DMSO или със средата на клетъчната култура и не са цитотоксични в изпитваните концентрации. Ако употребата на DMSO е невъзможна, може да се използва друг носител като например етанол или вода (вж. точка 12). Доказаната ефективност на VM7Luc ER TA изследването за (ант)агонисти предполага, че данните, генерирани с това изследване, могат да дадат информация за ER-медираните механизми на действие и биха могли да се разглеждат за целите на приоритизиране на веществата за по-нататъшни изпитвания.
3. Това изследване е специално разработено за откриване на hER α и hER β -медирана TA чрез измерване на хемилуминесцентността като крайна точка. Използването на хемилуминесценция в биологични изследвания е широко разпространено, защото

¹ Преди юни 2016 г., тази клетъчна линия се обозначаваеше като клетъчна линия BG1Luc. Клетките BG-1 бяха описани за първи път от Geisinger et al. (1998 г.) (12), а по-късно бяха характеризирани от изследователи от National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Относително скоро бе открито съществуването на два различни варианта на клетките BG-1, използвани от изследователите, BG-1 Fr и BG-1 NIEHS. Бе извършен задълбочен анализ, включително ДНК изпитване на тези два варианта на клетъчните линии на BG-1 от Li и сътрудници (2014 г.) (14), който показва, че BG-1 Fr е уникална, а BG-1 NIEHS, т.е. оригиналната клетъчна линия, използвана за разработване на изследването, не е клетъчната линия BG1 на човешки овариален карцином, а е вариант на клетъчната линия MCF7 на човешки рак на гърдата. Клетъчната линия, използвана в изследването, която първоначално се е наричала BG1Luc4E2 (15), сега ще бъде обозначена като VM7Luc4E2 („V“ = вариант; „M7“ = MCF7 клетки). По същия начин, изследването вече ще се обозначава като VM7Luc ER TA. Макар това да променя произхода на клетъчната линия, на която се базира изследването, то не оказва влияние върху публикуваните изследвания за валидиране, нито полезността и приложението на настоящото изследване за скрининг на естрогенни/анти-естрогенни химикали.

луминесценцията има високо отношение сигнал-фон (10). Въпреки това, активността на луциферазата на светулка в изследвания, базирани на клетъчни култури, може да бъде смущавано от вещества, които потискат ензима луцифераза, причинявайки явно потискане и повишена луминесценция поради протеиновата стабилизация (10). Освен това, при някои основани на луциферазата изпитвания на ER с репортерни гени бяха докладвани немедирирани от рецептора луминисцентни сигнали, получени при по-висока от 1 μ M концентрация на фитоестроген, дължащи се на свърхактивиране на луциферазния репортерен ген (9) (11). Тъй като кривата доза-отклик показва, че истинската активация на ER системата възниква при по-ниски концентрации, експресията на луциферазата, получена при високи концентрации на фитоестрогени или подобни съединения, за които се подозира, че предизвикват подобно на фитоестрогена свърхактивиране на луциферазния репортерен ген, трябва да се изследва внимателно в системи за изследване на ER TA чрез стабилно трансфектиране (see Appendix 2).

4. Разделите „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“ и „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ER TA“ следва да бъдат прочетени, преди да се използва настоящото изследване за регулаторни цели. Използваните определения и съкращения в рамките на настоящия метод на изпитване са описани в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

5. Изследването се използва за доказване на свързване на ER с лиганда, последвано от транслокация на рецептор-лигандния комплекс в ядрото. След като попадне в клетъчното ядро, рецептор-лигандният комплекс се свързва със специфични елементи на ДНК отклика и трансактивира репортерния ген (*luc*), което води до производство на луцифераза и до последващото излъчване на светлина, което може да бъде определено количествено с помощта на луминометър. Луциферазната активност може да бъде измерена бързо и евтино с множество китове, налични в търговската мрежа. VM7Luc ER TA използва чувствителна към ER клетъчна линия от човешки аденокарцином на гърдата, VM7, която е била стабилно трансфектирана с модел на репортерен ген от светулка *luc* под контрола на четири елемента на естрогенния отклик, разположени преди вирусния промотор на миши тумор на млечната жлеза (MMTV), за откриване на вещества с *in vitro* активност на агонисти или антагонисти на ER. Този промотор на MMTV показва незначителна кръстосана реактивност с други стероидни и нестероидни хормони (8). Критериите за тълкуване на данните са описани подробно в точка 41. Накратко, положителният отклик се определя от кривата концентрация-отклик, съдържаща най-малко три точки с неприпокриващи се ленти на грешката (средна стойност $\pm$ SD), както и промяна на амплитудата (нормализирани относителни светлинни единици [RLU]) от най-малко 20% от максималната стойност за

референтния еталон (17 β -естрадиол [E2; CASRN 50-28-2] за изследването с агонисти, ралоксифен HCl [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 за изследването с антагонисти).

ПРОЦЕДУРА

Клетъчна линия

6. За изследването следва да се използва стабилно трансфектираната клетъчна линия VM7Luc4E2. Понастоящем клетъчната линия е налична само при подписано технически лицензионно споразумение от Калифорнийския университет, Davis, Калифорния, САЩ¹ и от Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Северна Каролина, САЩ².

Стабилност на клетъчната линия

7. За да се поддържа стабилността и целостта на клетъчната линия, клетките следва да бъдат култивирани за повече от един пасаж от замразеното количество в средата за клетъчно култивиране (вж. точка 9). Клетките не следва да бъдат култивирани повече от 30 пасажа. За клетъчната линия VM7Luc4E2, 30 пасажа са приблизително три месеца.

Клетъчна култура и условия на плаките за изследване

8. Процедурите, описани в Ръководството за добри практики при култивиране на клетки (5) (6), следва да бъдат спазвани, за да се осигури качеството на всички материали и методи с оглед поддържане на целостта, валидността и възпроизводимостта на всички провеждани процедури.
9. Клетките VM7Luc4E2 се отглеждат в среда RPMI 1640 с добавени 0,9% Pen-Strep и 8,0% фетален волски серум (FBS) в специален инкубатор за тъканни култури при 37°C $\pm$ 1°C, 90% $\pm$ 5% влажност и 5,0% $\pm$ 1% CO₂/въздух.
10. При достигане на ~80% сливане, клетките VM7Luc4E2 се субкултивират и кондиционират към среда без естроген в продължение на 48 часа, преди

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 САЩ, имейл: info@dioxins.com, телефон: 919-688-4804, факс: 919-688-4404

разпределянето им в 96-ямкови плаки за експозиция на изпитваните химикали и анализ на зависимата от естроген индукция на луциферазната активност. Средата без естроген (EFM) съдържа модифицирана от Дюлбеко среда на Игъл (DMEM) без фенолно червено, допълнена с 4,5% FBS, третиран с въглен/декстран, 1,9% L-глутамин и 0,9% Pen-Strep (пеницилин-стрептомицин). Всички пластмасови съдове и пособия следва да нямат естрогенна активност [вж. подробния протокол (7)].

Критерии за приемливост

11. Приемането или отхвърлянето на изпитване се прави на базата на оценката на резултатите, получени за референтните еталони и контролите от всеки експеримент, проведен върху 96-ямковата плака. Всеки референтен еталон се изпитва в множество концентрации, като има множество проби от всяка концентрация на референтно и контролно вещество. Резултатите се сравняват спрямо качествените контроли (КК) за тези параметри, които са получени от базите данни от изпитванията с агонисти и антагонисти от предходни периоди, генерирани от всяка лаборатория по време на доказването на пригодността. Базите данни от предходни периоди се актуализират непрекъснато със стойностите на референтните еталони и контролните вещества. Промените в оборудването или лабораторните условия може да наложат генериране на актуализирани бази данни от предходни периоди.

Изпитване с агонисти

Изпитване за определяне на обхват

- Индукция: Индукцията в плаката следва да бъде измервана чрез разделяне на средната стойност на относителната светлинна единица (RLU) на референтен еталон с най-високо съдържание на E2 на средната RLU стойност на DMSO контрола. Обикновено се получава петкратна индукция, но за целите на приемането, индукцията следва да бъде четирикратна или по-голяма.
- Резултати от контролата с DMSO: Стойностите на RLU за контролата на разтворителя следва да бъдат в рамките на 2,5 пъти стандартното отклонение на средната стойност на RLU от предходни периоди от контролата на разтворителя.
- Експеримент, който не изпълни който и да било критерий за приемливост, следва да бъде бракуван и повторен.

Цялостно изпитване

То включва критерии за приемливост от изпитването за определяне на обхват на агонистите и следното:

- Резултати за референтния еталон: Кривата концентрация-отклик на референтния еталон E2 следва да бъде сигмоидална по форма и да има най-малко три стойности в рамките на линейната си част.

- Резултати от положителната контрола: Стойностите на RLU за контролата на метоксихлор следва да бъдат по-високи от средната стойност за DMSO плюс три пъти стандартното отклонение от средната стойност за DMSO.
- Експеримент, който не изпълни всеки отделен критерий за приемливост, следва да бъде бракуван и повторен.

Изпитване с антагонисти

Изпитване за определяне на обхват

- Редукция: Редукцията в плаката се измерва чрез разделяне на средната RLU стойност на референтен еталон с най-високо съдържание на Ral/E2 на средната RLU стойност на DMSO контрола. Обикновено се получава петкратна редукция, но за целите на приемането, редукцията следва да бъде по-голяма от или равна на трикратна.
- Резултати от контрола на E2: RLU стойностите за контрола на E2 следва да бъдат в рамките на 2,5 пъти стандартното отклонение на историческата средна RLU стойност на контрола на E2.
- Резултати от контролата с DMSO: RLU стойностите за контрола на DMSO следва да бъдат в рамките на 2,5 пъти стандартното отклонение на историческата средна RLU стойност на контрола на разтворителя.
- Експеримент, който не изпълни всеки отделен критерий за приемливост ще бъде бракуван и повторен.

Цялостно изпитване

То включва критерии за приемане от изпитването за определяне на обхват на антагонистите и следното:

- Резултати за референтния еталон: Кривата концентрация-отклик на референтния еталон Ral/E2 следва да бъде сигмоидална по форма и да има най-малко три стойности в рамките на линейната част от нея.
- Резултати от положителната контрола: RLU стойностите за контрола на тамоксифен/E2 следва да бъдат по-малки от средната стойност за контрола на E2 минус три пъти стандартното отклонение от средната стойност за контрола на E2.
- Експеримент, който не изпълни всеки отделен критерий за приемливост, ще бъде бракуван и повторен.

Референтни еталони, положителни контроли и контроли на носителя

Контрол на носителя (изследвания с агонисти и антагонисти)

12. Носителят, който е използван за разтваряне на изпитваните химикали, следва да бъде изпитан като контрола на носителя. Използваният носител по време на валидирането на изследването с VM7Luc ER TA беше 1% (v/v) диметилсулфоксид (DMSO, CASRN 67-68-5) (вж. точка 24). Ако е използван носител, различен от DMSO, всички

референтни еталони, контроли и изпитвани химикали следва да бъдат изпитани в същия носител, ако е приложимо.

Референтен еталон (за определяне на обхвата на агонисти)

13. Референтният еталон е E2 (CASRN 50-28-2). За изпитвания за определяне на обхвата, референтният еталон се състои от серийно разреждане на четири концентрации на E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ и $2,87 \times 10^{-12}$ M), като всяка концентрация е изпитана в дублирани ямки.

Референтен еталон (цялостен за агонисти)

14. E2 за цялостно изпитване се състои от 1:2 серийно разреждане, съставено от 11 концентрации (вариращи от $3,67 \times 10^{-10}$ до $3,59 \times 10^{-13}$ M) на E2 в дублирани ямки.

Референтен еталон (за определяне на обхвата на антагонисти)

15. Референтният еталон е комбинация от Ral (CASRN 84449-90-1) и E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 за изпитването за определяне на обхват се състои от серийно разреждане на три концентрации на Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ и $1,92 \times 10^{-10}$ M) плюс една фиксирана концентрация ($9,18 \times 10^{-11}$ M) на E2 в дублирани ямки.

Референтен еталон (цялостно изпитване с антагонисти)

16. Ral/E2 за цялостно изпитване се състои от 1:2 серийно разреждане на Ral (вариращо от $2,45 \times 10^{-8}$ до $9,57 \times 10^{-11}$ M) плюс една фиксирана концентрация ($9,18 \times 10^{-11}$ M) на E2 съставена от девет концентрации на Ral/E2 в дублирани ямки.

Слаба положителна контрола (агонисти)

17. Слабата положителна контрола е $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-метоксихлор (метоксихлор; CASRN 72-43-5) в EFM.

Слаба положителна контрола (антагонисти)

18. Слабата положителна контрола се състои от тамоксифен (CASRN 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M с $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 в EFM.

Контрол на E2 (само за изследването с антагонисти)

19. Контролата на E2 е $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 в EFM и се използва като базова стойност за отрицателната контрола.

Кратна индукция (агонисти)

20. Индукцията на луциферазна активност на референтния еталон (E2) се измерва чрез разделяне на средната стойност на RLU на референтен еталон с най-високо съдържание на E2 на средната стойност на RLU на контролата с DMSO, като резултатът следва да бъде по-голям от четирикратен.

Кратна редукция (антагонисти)

21. Средната луциферазна активност на референтния еталон (Ral/E2) се измерва чрез разделяне на средната стойност на RLU на референтен еталон с най-високо съдържание на Ral/E2 на средната стойност на RLU на контрола с DMSO, като резултатът следва да бъде по-голям от трикратен.

Доказване на пригодността на лабораторията (вж. точка 14 и таблици 3 и 4 в „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО НА ER TA“ от настоящия метод за изпитване)

Носител

22. Изпитваните химикали следва да бъдат разтваряни в разтворител, който разтваря изпитвания химикал и се смесва с клетъчната среда. Подходящи носители са вода, етанол (с чистота 95% до 100%) и DMSO. Ако се използва DMSO, нивото не следва да превишава 1% (v/v). За всеки носител следва да се докаже, че максималния използва обем не е цитотоксичен и не оказва отрицателно влияние върху ефективността на изследването. Референтните еталони и контроли се разтварят в 100% разтворител и след това се разреждат до подходящи концентрации в EFM.

Приготвяне на изпитваните химикали

23. Изпитваните химикали се разтварят в 100% DMSO (или подходящ разтворител) и след това се разреждат до подходящи концентрации в EFM. Всички изпитвани химикали следва да бъдат оставени да се аклиматизират към стайната температура, преди да бъдат разтваряни и разреждани. Разтворите на изпитваните химикали следва да бъдат прясно приготвени за всеки експеримент. Разтворите не следва да имат забележим преципитат или помътняване. Основните разтвори на референтните еталони и контролите могат да бъдат приготвени в по-големи количества; въпреки това, окончателните разреждания на референтния еталон, контролите и изпитваните химикали следва да бъдат прясно приготвени за всеки експеримент и използвани в рамките на 24 часа след приготвянето.

Разтворимост и цитотоксичност: Съображения при определянето на обхвати

24. Изпитването за определяне на обхват се състои от седем точки - 1:10 серийни разреждания, изпълнени с дублиране. Първоначално изпитваните химикали се изпитват до максималната концентрация от 1 mg/ml (~1 mM) за изпитването на агонисти и 20 µg/ml (~10 µM) за изпитването с антагонисти. Експериментите за определяне на обхвати се използват за определяне на следното:
- Началните концентрации на изпитвания химикал, които ще бъдат използвани по време на цялостното изпитване

- Началните разреждания на химикала (1:2 или 1:5), които ще бъдат използвани по време на цялостното изпитване

25. Оценката на клетъчната жизнеспособност/цитотоксичност е включена в протоколите за изследване на агонисти и антагонисти (7) и е внедрена в изпитването за определяне на обхват и в цялостното изпитване. Методът за определяне на цитотоксичност, който е използван за оценяване на клетъчната жизнеспособност по време на валидирането на VM7Luc ER TA (1) е бил мащабиран метод за качествено визуално наблюдение; въпреки това може да се използва количествен метод за определяне на цитотоксичността (вж. протокол (7)). Данните от концентрациите на изпитвания химикал, които причиняват повече от 20% редукция на жизнеспособността, не могат да бъдат използвани.

Експозиция на изпитвания химикал и организация на плаката за изследването

26. Клетките се отброяват и поставят в EFM в 96-ямкови плаки за тъканни култури (2×10^5 клетки в ямка) и инкубират за 24 часа, за да се позволи на клетките да се прикрепят към плаката. EFM се отстранява и се подменя с изпитваните и референтните химикали в EFM и се инкубират за 19-24 часа. Относно веществата, които са силно летливи трябва да се приложат специални съображения, тъй като ямките с контроли в непосредствена близост могат да генерират неверни положителни резултати. В такива случаи, „запечатващите филми“ могат да помогнат за ефективно изолиране на отделните ямки по време на изпитване и по тази причина са препоръчителни.

Изпитвания за определяне на обхват

27. Изпитването за определяне на обхват използва всички ямки на 96-ямковата плака за изпитване на до шест изпитвани химикала като седем точкови разреждания 1:10 изпълнени с дублиране (вж. фигури 1 и 2).

- Изпитването за определяне на обхват на *агонисти* използва четири концентрации на E2 с дублиране, като референтния еталон и четири ямки за повторения за контролата с DMSO.
- Изпитването за определяне на обхват на *антагонисти* използва три концентрации на Ral/E2 с $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 с дублиране, като референтния еталон, три ямки за повторения за E2 и за контролите с DMSO.

Фигура 1: Разположение на 96-ямковата плака за изпитването за определяне на обхват на агонисти

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
Б	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
В	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Г	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
Д	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
Е	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Ж	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
З	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Съкращения: E2-1 до E2-4 = концентрации на референтния еталон E2 (от висока към ниска); TC1-1 до TC1-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 1 (TC1); TC2-1 до TC2-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 2 (TC2); TC3-1 до TC3-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 3 (TC3); TC4-1 до TC4-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 4 (TC4); TC5-1 до TC5-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 5 (TC5); TC6-1 до TC6-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 6 (TC6); VC = контрол на носителя (DMSO [1% v/v EFM.]).

Фигура 2: Разположение на 96-ямковата плака за изпитването за определяне на обхват на антагонисти

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
Б	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
В	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Г	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
Д	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
Е	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Ж	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
З	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Съкращения: E2 = E2 контрол; Ral-1 до Ral-3 = концентрации на референтния еталон Ралоксифен/E2 (от висока към ниска); TC1-1 до TC1-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 1 (TC1); TC2-1 до TC2-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 2 (TC2); TC3-1 до TC3-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 3 (TC3); TC4-1 до TC4-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 4 (TC4); TC5-1 до TC5-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 5 (TC5); TC6-1 до TC6-7 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 6 (TC6); VC = контрол на носителя (DMSO [1% v/v EFM.]).

Забележка: Всички изпитвани химикали са изпитани в присъствието на $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Препоръчителният окончателен обем на средата, необходима за всяка ямка, е 200 μ l. Използват се само тестови плаки, в които клетките във всички ямки показват жизнеспособност от 80% и повече.
29. Определянето на началните концентрации за цялостното изпитване с **агонисти** е описано задълбочено в протокола с агонисти (7). Накратко, използват се следните критерии:
- Ако на кривата на концентрацията на изпитвания химикал няма точки, които са по-големи от средната стойност плюс три пъти стандартното отклонение на контролата с DMSO, се провежда цялостно изпитване, като се използва 11-точково серийно разреждане 1:2, започващо от максималната разтворима концентрация.
 - Ако на кривата на концентрацията на изпитвания химикал има точки, които са по-големи от средната стойност плюс три пъти стандартното отклонение на контролата с DMSO, началната концентрация, която се използва за 11-точковата схема за разреждане при цялостното изпитване, следва да бъде един логаритъм по-висока от концентрацията, даваща най-високата коригирана стойност на RLU при изпитването за определяне на обхват. 11-точковата схема на разреждане е базирана на разреждания 1:2 или 1:5, в съответствие със следните критерии:

Следва да бъде използвано 11-точково серийно разреждане 1:2, ако полученият обхват на концентрацията включва пълния диапазон от отклици на базата на кривата концентрация-отклик, генерирана в рамките на изпитването за определяне на обхват. В противен случай, се използва разреждане 1:5.
 - Ако даден изпитван химикал покаже двуфазна крива концентрация-отклик в рамките на изпитването за определяне на обхват, двете фази следва също да бъдат определени в цялостно изпитване.
30. Определянето на началните концентрации за цялостното изпитване с **антагонисти** е описано задълбочено в протокола с антагонисти (7). Накратко, използват се следните критерии:
- Ако на кривата на концентрацията на изпитвания химикал няма точки, които са по-малки от средната стойност минус три пъти стандартното отклонение на E2, се провежда цялостно контролно изпитване, като се използва 11-точково серийно разреждане 1:2, започващо от максималната разтворима концентрация.
 - Ако на кривата на концентрацията на изпитвания химикал има точки, които са по-малки от средната стойност минус три пъти стандартното отклонение на E2 контрола, началната концентрация, която се използва за 11-точковата схема за разреждане при цялостното изпитване следва да бъде една от следните:

- Концентрацията, даваща най-ниската коригирана стойност на RLU в рамките на изпитването за определяне на обхват
 - Максималната концентрация на разтваряне (вж. протокола с антагонисти (7), фигура 14-2)
 - Най-ниската цитотоксична концентрация (Виж протокола с антагонисти (7), фигура 14-3 за свързан пример).
- 11-точковата схема на разреждане се базира на разреждания 1:2 или 1:5 серийно разреждане или разреждане в съответствие със следните критерии:

Следва да бъде използвано 11-точково серийно разреждане 1:2, ако полученият обхват на концентрацията включва пълния диапазон от отклици на базата на кривата концентрация-отклик, генерирана в рамките на изпитването за определяне на обхват. В противен случай следва да се използва разреждане 1:5.

Цялостни изпитвания

31. Цялостното изпитване се състои от 11-точкови серийни разреждания (серийни разреждания 1:2 или 1:5, базирани на началната концентрация за критериите на цялостното изпитване), като всяка концентрация се изпитва трикратно в 96-ямовата плака (вж. фигури 3 и 4).
- Цялостното изпитване с *агонисти* използва 11 дублирани концентрации на E2 като референтен еталон. Във всяка плака са включени четири ямки за повторение за контролата с DMSO и четири ямки за повторение за контрола с метоксихлор ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - Цялостното изпитване с *антагонисти* използва девет дублирани концентрации на Ral/E2 с $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 като референтен еталон, с четири ямки за повторение за контрола с E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M, четири ямки за повторение за контроли с DMSO и четири ямки за повторение за тамоксифен $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Фигура 3: Разположение на 96-ямковата плака за цялостното изпитване с агонисти

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Б	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
В	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Г	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
Д	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
Е	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
Ж	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
З	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Съкращения: TC11-1 до TC1-11 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 1; TC2-1 до TC2-11 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 2; E2-1 до E2-11 = концентрации на референтния еталон E2 (от висока към ниска); Meth = p,p' метоксихлор, слаба положителна контрола; VC = DMSO (1% v/v) EFM контрол на носителя

Фигура 4: Разположение на 96-ямковата плака за цялостното изпитване на антагонисти

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Б	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
В	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Г	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
Д	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
Е	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
Ж	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
З	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Съкращения: E2 = E2 контрол; Ral-1 до Ral-9 = концентрации на референтния еталон Ралоксифен/E2 (от висока към ниска); Tam = Тамоксифен/E2 слаба положителна контрола; TC1-1 до TC1-11 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 1 (TC1); TC2-1 до TC2-11 = концентрации (от висока към ниска) на изпитван химикал 2 (TC2); VC = контрола на носителя (DMSO [1% v/v EFM.]).

Забележка: Както бе отбелязано, всички ямки с референтния химикал и изпитваните вещества съдържат фиксирана концентрация на E2 (9,18 x 10⁻¹¹M)

32. С цел осигуряване на независимост на резултатите, следва да бъдат проведени повторни цялостни изпитвания за същия химикал в различни дни. Най-малко две цялостни изпитвания следва да бъдат проведени. Ако резултатите от изпитванията си противоречат (напр. едното изпитване е положително, а другото отрицателно) или ако

едно от изпитванията е непригодно, следва да се проведе трето, допълнително изпитване.

Измерване на луминесценцията

33. Луминесценцията се измерва в диапазона от 300 до 650 nm, с помощта на впръскващ луцинометър и софтуер, който контролира обема за впръскване и интервала за измерване (7). Излъчването на светлина от всяка ямка се изразява като RLU на ямката.

АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

Определяне на EC₅₀ / IC₅₀

34. Стойността на EC₅₀ (половината от максимално ефективната концентрация на изпитвания химикал [агонисти]) и стойността на IC₅₀ (половината от максималната потискаща концентрация на изпитвания химикал [антагонисти]) се определят от данните за отклика спрямо концентрацията. За изпитваните химикали, които са положителни в една или повече концентрации, концентрацията на изпитвания химикал, която причинява половината от максималния отклик (IC₅₀ или EC₅₀), се изчислява, като се използва анализ с функцията на Хил или друг подходящ алтернативен метод. Функцията на Хил е логистичен математически модел с четири параметъра, свързващ концентрацията на изпитвания химикал с отклика (обикновено се следва „S“-образна крива) като използва уравнението по-долу:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}}$$

Където:

Y = отклик (т.е. RLU);

X = логаритъмът от концентрацията;

Най-ниско ниво (Bottom) = минималният отклик;

Най-високо ниво (Top) = максималният отклик;

lg EC₅₀ (или lg IC₅₀) = логаритъмът от X като отклик по средата между най-високото и най-ниското ниво;

Hillslope = наклонът на кривата.

Моделът изчислява най-подходящата стойност за параметрите „Най-високо ниво“, „Най-ниско ниво“, „Hillslope“, IC₅₀ и EC₅₀. За изчисляването на стойностите за EC₅₀ и IC₅₀ следва да се използва подходящ софтуер за статистически изчисления (напр. Graphpad Prism^R).

Определяне на силно отклоняващи се стойности

35. Добрата статистическа преценка може да бъде улеснена чрез включване (но не само) на Q-test (вж. протоколите с агонисти и антагонисти (7) за определяне на „неизползваемите“ ямки, които ще бъдат изключени от анализа на данните.
36. За повторенията на референтния еталон E2 (двоен размер на пробата), всяка коригирана стойност на RLU за повторение при дадена концентрация на E2 се разглежда като силно отклоняваща се стойност, ако стойността ѝ е с повече от 20% над или под коригираната стойност на RLU за тази концентрация в базата данни от предходни периоди.

Събиране и коригиране на данните от луцинометъра за изпитването за определяне на обхват

37. Необработените данни от луцинометъра следва да бъдат прехвърлени в шаблон на електронна таблица, разработен специално за изследването. След това трябва да се определи дали има точки с данни със силно отклоняващи се стойности, които да бъдат премахнати. (Относно параметрите, които се определят в рамките на анализите, вж. критериите за приемане на изпитване.) Следва да се извършат следните изчисления:

Агонист

- Стъпка 1 Изчислява се средната стойност за контролата на носителя (VC) DMSO.
- Стъпка 2 Изважда се средната стойност на DMSO VC от стойността за всяка ямка за нормализиране на данните.
- Стъпка 3 Изчислява се средната стойност за кратната индукция за референтния еталон (E2).
- Стъпка 4 Изчислява се средната стойност на EC₅₀ за изпитваните химикали.

Антагонист

- Стъпка 1 Изчислява се средната стойност за DMSO VC.
- Стъпка 2 Изважда се средната стойност на DMSO VC от стойността за всяка ямка за нормализиране на данните.
- Стъпка 3 Изчисляване на средната стойност за кратната индукция за референтния еталон (R_{al}/E2).
- Стъпка 4 Изчисляване на средната стойност за референтния еталон E2.
- Стъпка 5 Изчисляване на средната стойност на IC₅₀ за изпитваните химикали.

Събиране и коригиране на данните от луцинометъра за цялостното изпитване

38. Необработените данни от луцинометъра следва да бъдат прехвърлени в шаблон на електронна таблица, разработен специално за изследването. След това трябва да се определи дали има точки с данни със силно отклоняващи се стойности, които да бъдат премахнати. (Относно параметрите, които се определят в рамките на анализите, вж. критериите за приемане на изпитване.) Следва да се извършат следните изчисления:

Агонист

Стъпка 1 Изчислява се средната стойност за DMSO VC.

Стъпка 2 Изважда се средната стойност на DMSO VC от стойността за всяка ямка за нормализиране на данните.

Стъпка 3 Изчислява се средната стойност за кратната индукция за референтния еталон (E2).

Стъпка 4 Изчисляване на средната стойност на EC₅₀ за E2 и изпитваните химикали.

Стъпка 5 Изчисляване на средната коригирана RLU стойност за метоксихлор.

Антагонист

Стъпка 1 Изчислява се средната стойност за DMSO VC.

Стъпка 2 Изважда се средната стойност на DMSO VC от стойността за всяка ямка за нормализиране на данните.

Стъпка 3 Изчислява се средната стойност за кратната индукция за референтния еталон (Ral/E2).

Стъпка 4 Изчислява се средната стойност на IC₅₀ за Ral/E2 и изпитваните химикали.

Стъпка 5 Изчислява се средната коригирана стойност на RLU за тамоксифен.

Стъпка 6 Изчислява се средната стойност за референтния еталон E2.

Критерии за тълкуване на данните

39. Изследването VM7Luc ER TA е предвидено да бъде част от подхода, основан на определяне на тежестта на доказателствата, който спомага за приоритизирането на веществата за изпитванията *in vivo* на нарушителите на функциите на ендокринната система. Част от тази процедура за приоритизиране е класифицирането на изпитвания химикал като положителен или отрицателен в активността му на агонист или антагонист на ER. Критериите за определяне на химикала като положителен или отрицателен, използвани в рамките на изследването за валидиране VM7Luc ER TA, са описани в таблица 1.

Таблица 1: Критерии за вземане на положително или отрицателно решение

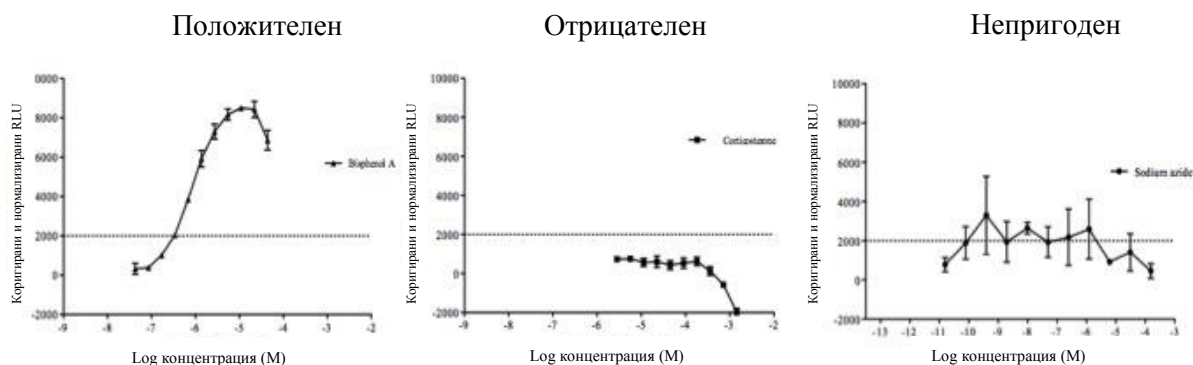
АКТИВНОСТ НА АГОНИСТ

За положително решение	- Кривата концентрация-отклик на всички изпитвани химикали, класифицирани като <i>положителни</i> за активност на агонист на ER, следва да се състои от основна линия, последвана от положителен наклон и завършваща с плато или с пик. В някои случаи могат да бъдат дефинирани само две от тези характеристики (основна линия–възходящ наклон или възходящ наклон–пик). - Линията, дефинираща положителния наклон, следва да съдържа най-малко три точки с неприпокриващи се ленти на грешка (средна стойност $\pm$ SD). Точките, образуващи основната линия се изключват, но линейният участък от кривата може да включва пика или първата точка от платото. - За положителна квалификация се изисква амплитуда на отклика (разликата между основната линия и пика) от най-малко 20% от максималната стойност за референтния еталон E2 (т.е. 2000 RLU или повече, когато максималната стойност на отклика на референтните еталони [E2] е коригирана до 10 000 RLU). - Ако е възможно, стойността EC₅₀ следва да бъде изчислена за всеки положителен изпитван химикал.
За отрицателно решение	Средната коригирана стойност на RLU за дадена концентрация е равна на средната стойност на RLU за контролата с DMSO плюс три пъти стандартното отклонение на RLU за DMSO, или по-ниска.
Непригоден	Данни, които не могат да бъдат интерпретирани като валидни за демонстриране на наличието или отсъствието на активност, поради съществени качествени или количествени ограничения и се разглеждат като непригодни, и не могат да бъдат използвани за определяне на изпитвания химикал като положителен или отрицателен. Химикалите следва да бъдат изпитани повторно.
АКТИВНОСТ НА АНТАГОНИСТ	
За положително решение	- Данните за изпитвания химикал съставят крива на концентрация-отклик, състояща се от основна линия, която е последвана от крива с отрицателен (низходящ) наклон. - Линията, дефинираща отрицателния наклон, следва да съдържа най-малко три точки с неприпокриващи се ленти на грешка; Точките, образуващи основната линия, се изключват, но линейният участък от кривата може да включва първата точка от платото. - Трябва да има най-малко 20% намаление в активността от максималната стойност на референтния еталон Ral/E2 (т.е. 8000 RLU или по-малко, когато максималната стойност на отклика на референтния еталон [Ral/E2] е коригирана до 10 000 RLU). - Най-високите нетоксични концентрации на изпитвания химикал следва да бъдат равни на 1×10^{-5} M или по-ниски. - Ако е възможно, стойността IC₅₀ следва да бъде изчислена за всеки положителен изпитван химикал.

За отрицателно решение	Всички точки с данни са над стойността на ED ₈₀ (80% от отклика на E2 или 8000 RLU), при концентрации, по-ниски от $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Непригодни	Данните, които не могат да се интерпретират като валидни за доказване на наличието или отсъствието на активност, поради съществени качествени или количествени ограничения, се разглеждат като непригодни, и не могат да бъдат използвани за определяне на изпитвания химикал като положителен или отрицателен. Химикалът следва да бъде изпитан повторно.

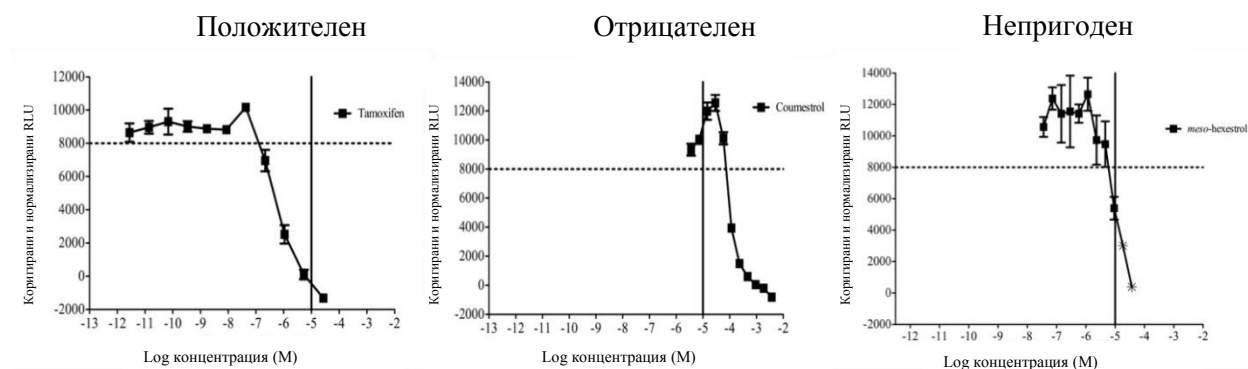
40. Когато е възможно, положителните резултати се характеризират както от големината на ефекта, така и от концентрацията, при която възниква този ефект. Примери за положителни, отрицателни и непригодни данни са показани на фигури 5 и 6.

Фигура 5: Примери за агонисти: Положителни, отрицателни и непригодни данни



Пунктирната линия означава 20% от отклика на E2, 2000 коригирани и нормализирани RLU.

Фигура 6: Примери за антагонисти: Положителни, отрицателни и непригодни данни



Пунктирната линия означава 80% от отклика на Ral/E2, 8000 коригирани и нормализирани RLU.

Плътната линия означава $1,00 \times 10^{-5}$ M. За да се разглежда даден отклик като положителен, той следва да бъде под линията за 8000 RLU, и с концентрация, по-ниска от $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Концентрациите, обозначени със звезда в графиката с мезо-хексестрол, означават степен на жизнеспособност от „2“ или по-висока.

Резултатите от изпитването на мезо-хексестрол се разглеждат като непригодни данни, защото единственият отклик, който е под 8000 RLU, възниква при $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Изчисляването на EC_{50} и IC_{50} може да бъде направено с помощта на функция на Хил с четири параметъра (за повече подробности, вж. протокола с агонисти и антагонисти (7)). Изпълнението на критериите за приемливост показва, че системата функционира правилно, но не гарантира, че всяка конкретна серия ще даде точни данни. Дуплицирането на резултатите от първата серия е най-добрата гаранция, че се получават точни данни (вж. точка 19 от „КОМПОНЕНТИ НА ER TA изследването“).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

42. Вж. параграф 20 на „КОМПОНЕНТИ НА АНАЛИЗА ER TA“.

ЛИТЕРАТУРА

(11)

ДОПЪЛНЕНИЕ 4

ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТРАНСАКТИВАЦИЯ ЧРЕЗ СТАБИЛНО ТРАНСФЕКТИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР-А С ЦЕЛ ОТКРИВАНЕ НА АКТИВНОСТ НА ЕСТРОГЕННИ АГОНИСТИ И АНТАГОНИСТИ НА ХИМИКАЛИ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА КЛЕТЪЧНАТА ЛИНИЯ ER α CALUX

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

1. Настоящото изследване за трансактивация на ER α CALUX използва човешката клетъчната линия U2OS за откриване на активност на естрогенен агонист и антагонист, медирана от човешки естрогенен рецептор алфа (hER α). Изследването за валидиране на биологичното изследване на стабилно трансфектиран ER α CALUX от BioDetection Systems BV (Амстердам, Нидерландия) доказва относимостта и надеждността на изследването за предвидената цел (1). Клетъчната линия ER α CALUX експресира само стабилно трансфектиран човешки ER α (2) (3).
2. Настоящото изследване е специално разработено за откриване на hER α -медирана трансактивация чрез измерване на биолуминесценцията като крайна точка. Използването на биолуминесценцията в биоизследванията е обичайно поради високото ѝ съотношение сигнал/шум (4).
3. Докладвано е, че концентрации на фитоестроген, по-високи от 1 μ M, предизвикват свръхактивиране на луциферазния репортерен ген, което води до луминесценция, която не е медирана от рецептори (5) (6) (7). Ето защо по-високите концентрации на фитоестрогени или други подобни съединения, които могат да предизвикат свръхактивиране на експресията на луцифераза, трябва внимателно да се изследват при изследванията за трансактивация на стабилно трансфектирани ER (вж. допълнение 2).
4. Разделите „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“ и „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ER TA“ следва да бъдат прочетени, преди да се използва настоящото изследване за регулаторни цели. Използваните определения и съкращения в рамките на настоящия метод за изпитване са описани в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

5. Биоизследването се използва за оценяване на свързването на ER лиганда и последващата транслокация на рецептор-лигандния комплекс в ядрото. В клетъчното ядро, комплексът рецептор-лиганд се свързва със специфични елементи на ДНК отклик и трансактивира луциферазния репортерен ген на светулка, което води до повишена клетъчна експресия на ензима луцифераза. След добавяне на луциферазния

субстрат луцеферин, последният се трансформира в биолуминесцентен продукт. Предизвиканата светлина може лесно да бъде открита и определена количествено с използване на луминометър.

6. Изпитвателната система използва стабилно трансфектирани клетки ER α CALUX. Клетките ER α CALUX произлизат от клетъчната линия U2OS на човешки остеобластен остеосарком. Човешките клетки U2OS бяха стабилно трансфектирани с 3xHRE-TATA-Luc и pSG5-neo-hER α по метода на копреципитация с калциев фосфат. Клетъчната линия U2OS бе избрана като най-добър кандидат, който да служи като чувствителна към естроген (и други стероидни хормони) репортерна клетъчна линия, въз основа на наблюденията, че клетъчната линия U2OS има незначителна или никаква активност като ендогенен рецептор. Отсъствието на ендогенни рецептори бе оценено единствено с използването на репортерни плазмиди за луцифераза, които не показаха активност, когато бяха добавени рецепторните лиганди. Освен това тази клетъчна линия поддържа силни медирани от хормони отклици, когато случайно бяха въведени сродни рецептори (2) (3) (8).
7. Изпитването на химикали за естрогенна и анти-естрогенна активност с използване на клетъчната линия ER α CALUX включва предварителна скринингова серия и цялостна серия. По време на предварителната скринингова серия се определят разтворимостта, цитотоксичността и оптимизираните стойности на кривата концентрация-обхват на изпитваните химикали за цялостно изпитване. В сериите на цялостно изпитване оптимизираните стойности на кривата концентрация-обхват на изпитваните химикали се изпитват в рамките на биоизследванията с ER α CALUX, след което изпитваните химикали се класифицират според техния агонизъм или антагонизъм.
8. Критериите за тълкуване на данните са описани подробно в точка 59. Накратко, даден изпитван химикал се разглежда като положителен за агонизъм в случай че най-малко две последователни концентрации на изпитвания химикал покажат отклик, който е равен или по-висок от 10% от максималния отклик на референтния еталон 17 β -естрадиол (PC₁₀). Изпитван химикал се разглежда като положителен за антагонизъм в случай че най-малко две последователни концентрации на изпитвания химикал покажат отклик, който е равен или по-нисък от 80% от максималния отклик на референтния еталон тамоксифен (PC₈₀).

ПРОЦЕДУРА

Клетъчни линии

9. За изследването следва да се използва стабилно трансфектираната клетъчна линия U2OS ER α CALUX. Клетъчната линия може да се набави от BioDetection Systems BV, Амстердам, Нидерландия чрез техническо лицензионно споразумение.

10. Следва да се използват само клетъчни култури, които не съдържат микоплазма. Използваните клетъчни партии следва да бъдат сертифицирани като отрицателни за замърсяване с микоплазма или преди употребата им да се извърши изпитване за микоплазма. RT-PCR (полимеразната верижна реакция в реално време) следва да се използва като чувствителен метод за откриване на инфекции с микоплазма (9).

Стабилност на клетъчната линия

11. За да се поддържа стабилността и целостта на CALUX клетките, те следва да бъдат съхранявани в течен азот (-80°C). След размразяване на клетките за стартиране на нова култура, клетките следва да бъдат субкултивирани най-малко два пъти, преди да бъдат използвани за оценяване на естрогенната агонистична и антагонистична активност на химикали. Клетките не следва да бъдат субкултивирани за повече от 30 пасажа.
12. За да се следи стабилността на клетъчната линия във времето, следва да се провери способността за реагиране на системата за изпитване на агонистична и антагонистична активност, като се оцени EC_{50} или IC_{50} на референтния еталон. В допълнение следва да се наблюдава относителната индукция на пробата на положителната контрола (ПК) и на пробата на отрицателната контрола (NC). Резултатите следва да бъдат в съответствие с критериите за приемане за биоизследване с агонисти (таблица 3В) или антагонисти с $\text{ER}\alpha$ CALUX (таблица 4В). Референтните еталони, положителните и отрицателните контроли са дадени в таблица 1 и таблица 2 съответно за модела на изследване с антагонист и този на изследване с агонист.

Клетъчна култура и условия на плаките за изследване

13. Клетките U2OS следва да бъдат култивирани в среда на растеж (среда DMEM/F12 (1:1) с фенолно червено като индикатор на pH, допълнена с фетален волски серум (7,5%), аминокиселини, различни от незаменимите (1%), 10 единици/ml пеницилин, стрептомицин и генетицин (G-418) като маркер за селекция). Клетките следва да бъдат поставени в инкубатор с CO_2 (5% CO_2) при 37°C и 100% влажност. Когато се достигнат 85-95% сливане, клетките следва или да бъдат субкултивирани, или да бъдат приготвени за посяване в 96-ямкови микротитърни плаки. В последния случай, клетките следва да бъдат повторно суспендирани при концентрация от 1×10^5 клетки/ml в среда за изследване без съдържание на естроген (среда DMEM/F12 (1:1) без фенолно червено, допълнена с фетален волски серум, третиран с въглен с покритие от декстран (5% v/v), аминокиселини, различни от незаменимите (1% v/v), 10 единици/ml пеницилин и стрептомицин), и разпределени в ямите на 96-ямоквите микротитърни плаки (100 μl хомогенизирана клетъчна суспензия). Клетките следва да бъдат предварително инкубирани в инкубатор с CO_2 (5% CO_2 , 37°C , 100% влажност) за 24 часа преди експозицията. Пластмасовите пособия не трябва да съдържат естроген.

Критерии за приемливост

14. Агонистичната и антагонистичната активност на изпитвания(-те) химикал(и) се изпитва в рамките на изпитвателната серия. Изпитвателната серия се състои от максимум 6 микротитърни плаки. Всяка изпитвателна серия съдържа най-малко 1 пълна серия от разреждания на референтния еталон, проба на положителната контрола, проба на отрицателната контрола и контроли на разтворителя. Фигура 1 и 2 показват разпределението на плаките за изпитвателните серии с агонистична и антагонистична активност.
15. Всяко разреждане на референтните еталони, изпитваните химикали, всички контроли на разтворители и положителните и отрицателните контроли следва да бъдат трикратно анализирани. Всеки от трикратните анализи следва да изпълнява изискванията, посочени в таблица 3А и таблица 4А.
16. Пълна серия на разреждания на референтния еталон (17 β -естрадиол за агонизъм; тамоксифен за антагонизъм) се измерва на първата плака във всяка изпитвана серия. За да могат да се сравняват резултатите от анализа на останалите 5 микротитърни плаки с първата микротитърна плака, съдържаща цялата крива концентрация-отклик на референтния еталон, всички плаки следва да съдържат 3 контролни проби: контрола на разтворителя, най-висока изпитана концентрация на референтния еталон и приблизителната EC₅₀ (агонизъм), или IC₅₀ (антагонизъм) концентрация на референтния еталон. Съотношението на усреднените стойности от контролните проби от първата плака и оставащите 5 плаки следва да изпълнява изискванията, дадени в таблица 3В (агонизъм) или таблица 4В (антагонизъм).
17. За всяка от микротитърните плаки от изпитваната серия се изчислява z-коефициентът (10). Z-коефициентът се изчислява, като се използват откликите на най-високата и най-ниската концентрация на референтния еталон. За валидна се смята микротитърна плака, която изпълнява изискванията, посочени в таблица 3В (агонизъм) или таблица 4В (антагонизъм).
18. Референтният еталон следва да показва „S“-образна крива доза-отклик. Стойностите за EC₅₀ или IC₅₀, получени от отклика на серията разреждания на референтния еталон, следва да изпълняват изискванията, указани в таблица 3В (агонизъм) или таблица 4С (антагонизъм).
19. Всяка изпитвана серия следва да съдържа проба за положителна контрола и проба за отрицателна контрола. Изчислената относителна индукция на двете проби за положителна и за отрицателна контрола следва да изпълнява изискванията, указани в таблица 3В (агонизъм) или таблица 4С (антагонизъм).
20. По време на всички измервания следва да се измерва коефициентът на индукция на най-високата концентрация на референтния еталон, като се раздели средният отклик в

относителни светлинни единици (RLU) на най-високата концентрация на референтния еталон 17 β -естрадиол на средния отклик в RLU на контрола на референтния разтворител. Този коефициент на индукция следва да изпълнява минималните изисквания за кратна индукция, указани в таблица 3В (агонизъм) или таблица 4С (антагонизъм).

21. Единствено микротитърните плаки, които изпълняват всички посочени по-горе критерии за приемане, се разглеждат като валидни и могат да се използват за оценяване на отклика на изпитваните химикали.
22. Критериите за приемане са приложими за предварителните скринингови изпитвания и за цялостните изпитвания.

Таблица 1: Концентрации на референтния еталон, положителната контрола (ПК) и отрицателната контрола (NC) за биоизследването на CALUX с агонисти

	Вещество	CAS №	Обхват на изпитване (M)
Референтен еталон	17 β -естрадиол	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ - 1,0*10 ⁻¹⁰
положителна контрола (ПК)	17 α -метилтестостерон	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
отрицателна контрола (NC)	кортикостерон	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

Таблица 2: Концентрации на референтния еталон, положителната контрола (ПК) и отрицателната контрола (NC) за биоизследването на CALUX с антагонисти

	Вещество	CAS №	Обхват на изпитване (M)
Референтен еталон	тамоксифен	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ - 1,0*10 ⁻⁰⁵
положителна контрола (ПК)	4-хидрокситамоксифен	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹
отрицателна контрола (NC)	ресвератрол	501-36-0	1,0*10 ⁻⁰⁵

Таблица 3: Критерии за приемане за биоизследването на CALUX с агонисти на ER α

А - отделни проби в плака		Критерий
1	Максимално стандартно отклонение (%SD) на ямките за трикратно изпитване (за NC, ПК, всяко разреждане на изпитвания химикал и	< 15%

2	Максимално стандартно отклонение (%SD) на ямките за трикратно изпитване (за референтния еталон и контролите на разтворителя на	< 30%
3	Максимално изпускане на LDH, като мярка за цитотоксичност.	< 120%

В - в рамките на единична микротитърна плака

4	Съотношение на контрола на разтворителя на референтния еталон (C0; плака 1) и контрола на разтворителя на изпитвания химикал (SC; плаки 2 до x)	0,5 до 2,0
5	Съотношение на пригл. EC50 и най-високите концентрации на референтния еталон в плака 1 и пригл. EC50 и най-високите концентрации на референтния еталон в плаки 2 до x (C4, C8)	0,70 до 1,30
6	Z-коефициент за всяка плака	>0,6

С - в рамките на единична серия на анализ (всички плаки в една серия)

7	Сигмоидална крива на референтния еталон	Да (17β-естрадиол)
8	EC50 обхват на референтния еталон 17β-естрадиол	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ М
9	Минимална кратна индукция на най-високата концентрация на 17β-естрадиол, във връзка с контрола на разтворителя на референтния еталон.	5
10	Относителна индукция (%) ПК.	> 30%
11	Относителна индукция (%) ПК	<10%

Пригл.: приблизително; ПК: положителна контрола; NC: отрицателна контрола; SC: контрола на разтворителя на изпитвания химикал; C0: контрола на разтворителя на референтния еталон; SD: стандартно отклонение; LDH: лактат дехидрогеназа

Таблица 4: Критерии за приемане за биоизследването с CALUX с антагонисти на ERα

А - отделни проби в плака		Критерий
1	Максимално стандартно отклонение (%SD) на ямките за трикратно изпитване (за NC, ПК, всяко разреждане на изпитвания химикал и референтния еталон, контрол на разтворителя (C0))	< 15%
2	Максимално стандартно отклонение (%SD) на ямките за трикратно изпитване (за контрол на носителя (VC) и най-висока концентрация на референтния еталон (C8))	< 30%
3	Максимално изпускане на LDH, като мярка за цитотоксичност.	< 120%
В - в рамките на единична микротитърна плака		

4	Съотношение на контрола на разтворителя на референтния еталон (C0; плака 1) и контрола на разтворителя на изпитвания химикал (SC; плаки 2 до x)	0,70 до 1,30
5	Съотношение на пригл. IC50 на концентрациите на референтния еталон в плака 1 и пригл. IC50 на концентрациите на референтния еталон в плаки 2 до x (C4)	0,70 до 1,30
6	Съотношение на най-високите концентрации на референтния еталон в плака 1 и най-високите концентрации на референтния еталон в плаки 2 до x (C8)	0,50 до 2,0
7	Z-коэффициент за всяка плака	>0,6

С - в рамките на единична серия на анализ (всички плаки в една серия)

8	Сигмоидална крива на референтния еталон	Да (Тамоксифен)
9	IC50 обхват на референтния еталон (Тамоксифен)	1*10-8 - 1*10-7 М
10	Минимална кратна индукция на контрола на разтворителя на референтния еталон във връзка с най-високата концентрация на Тамоксифен.	2,5
11	Относителна индукция (%) ПК.	<70%
12	Относителна индукция (%) ПК	>85%

Пригл.: приблизително; ПК: положителна контрола; NC: отрицателна контрола; VC: контрол на носителя (контрол на разтворителя без фиксираната концентрация на референтния еталон за агонисти); SC: контрола на разтворителя на изпитвания химикал; C0: контрола на разтворителя на референтния еталон; SD: стандартно отклонение; LDH: лактат дехидрогеназа

Контрол на разтворителя/носителя, референтни еталони, положителни контроли, отрицателни контроли

23. Едни и същи контроли на разтворителя/носителя, референтни еталони, положителни контроли, отрицателни контроли следва да се използват както за предварителната скринингова серия, така и за сериите за цялостно изпитване. В допълнение, концентрацията на референтните еталони, положителните контроли и отрицателните контроли, следва да бъде една и съща.

Контрола на разтворителя

24. Разтворителят, който е използван за разтваряне на изпитваните химикали, следва да бъде изпитан като контрола на разтворителя. Диметилсулфоксид (DMSO, 1% (v/v); CASRN 67-68-5) се използва като носител по време на валидирането на биоизследването с CALUX за ER α . Ако се използва разтворител, различен от DMSO, всички референтни еталони, контроли и изпитвани химикали следва да бъдат изпитани в същия носител. Не трябва да се забравя, че контролата на разтворителя за изследванията с антагонисти съдържа фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17 β -естрадиол (с концентрация приблизително EC₅₀). За да се изпита разтворителят, използван за изследванията с агонисти, трябва да се приготви и изпита контрола на носителя.

Контрола на носителя (антагонизъм)

25. За изпитване за антагонизъм, средата на изследването се допълва с фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17 β -естрадиол (приблизително EC₅₀ концентрация). За да се изпита разтворителят, използван за разтваряне на изпитваните химикали за антагонизъм, следва да се приготви среда на изследването без да се допълва с фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17 β -естрадиол. Тази контролна проба е обозначена като контрола на носителя. Диметилсулфоксид (DMSO, 1% (v/v); CASRN 67-68-5) се използва като носител по време на валидирането на биоизследването с CALUX за ER α . Ако се използва разтворител, различен от DMSO, всички референтни еталони, контроли и изпитвани химикали следва да бъдат изпитани в същия носител.

Референтни еталони

26. Агонистичният референтен еталон е 17 β -естрадиол (таблица 1). Референтните стандарти обхващат серия от разреждания на осем концентрации на 17 β -естрадиол ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Антагонистичният референтен еталон е тамоксифен (таблица 2). Референтните стандарти обхващат серия от разреждания на осем концентрации на тамоксифен ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Всяка

от концентрациите на антагонистичния референтен еталон се ко-инкубира с фиксирана концентрация на агонистичния референтен еталон 17 β -естрадиол ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Положителна контрола

28. Положителната контрола в агонистичните проучвания е 17 α -метилтестостерон (таблица 1).
29. Положителната контрола в антагонистичните проучвания е 4-хидрокситамоксифен (таблица 2). Положителната контрола за антагонизъм се коинкубира с фиксирана концентрация на агонистичния референтен еталон 17 β -естрадиол ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Отрицателна контрола

30. Отрицателната контрола в проучванията за агонизъм е кортикостерон (таблица 1).
31. Отрицателната контрола в проучванията за антагонизъм ресвератрол (таблица 2). Отрицателната контрола за антагонизъм се коинкубира с фиксирана концентрация на агонистичния референтен еталон 17 β -естрадиол ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Доказване на пригодността на лабораторията (вж. точка 14 и таблици 3 и 4 в «КОМПОНЕНТИ НА ЕР ТА ИЗСЛЕДВАНЕТО» от настоящия метод за изпитване)

Носител

32. Разтворителят, използван за разтваряне на изпитваните химикали следва да разтваря напълно изпитвания химикал и следва да може да се смесва с клетъчната среда. Подходящи разтворители са DMSO, вода и етанол (с чистота от 95% до 100%). В случай, че като разтворител се използва DMSO, максималната концентрация на DMSO по време на инкубация не трябва да превишава 1% (v/v). Преди употреба, разтворителят следва да бъде изпитан за липса на цитотоксичност и влияние върху ефективността на изследванията.

Подготовка на референтните еталони, положителните контроли, отрицателните контроли и изпитваните химикали

33. Референтните еталони, положителните контроли, отрицателните контроли и изпитваните химикали се разтварят в 100% DMSO (или друг подходящ разтворител). След това трябва да се приготвят подходящи (сериенни) разреждания в същия разтворител. Преди разтваряне всички изпитвани химикали следва да бъдат оставени да се аклиматизират към стайната температура. Прясно приготвените изходни разтвори на референтните еталони, положителните контроли, отрицателните контроли и изпитваните химикали не трябва да имат забележими признаци на преципитат или помътняване. Основните разтвори на референтните еталони и контролите могат да бъдат приготвени в по-големи количества. Изходните разтвори на изпитваните

химикали следва да бъдат прясно приготвени преди всеки експеримент. Окончателните разреждания на референтния еталон, положителните контроли, отрицателните контроли и изпитваните химикали следва да бъдат прясно приготвени за всеки експеримент и използвани в рамките на 24 часа след приготвянето.

Разтворимост, цитотоксичност и определяне на обхват.

34. По време на предварителната скринингова серия се определя разтворимостта на изпитваните химикали в избрания разтворител. Приготвя се основен разтвор с максимална концентрация от 0,1 М. В случай, че тази концентрация покаже проблеми с разтворимостта, следва да се приготвят изходни разтвори с по-ниска концентрация, докато изпитваните химикали се разтворят напълно. По време на предварителната скринингова серия се изпитват серийни разреждания от 1:10 на изпитвания химикал. Максималната концентрация на изследването за изпитване на агонисти или антагонисти е 1 mM. След предварителния скрининг се получава подходящ уточнен обхват на концентрацията за изпитваните химикали, който следва да се изпита по време на цялостните серии. Използваните разреждания за цялостното изпитване следва да бъдат 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x и 3000x.
35. Изпитването за цитотоксичност е включено в протокола на изследването с агонисти и антагонисти (11). Изпитването за цитотоксичност е част от серията за предварителен скрининг и от сериите за цялостно изпитване. Използваният метод за оценяване на цитотоксичността по време на валидирането на биоизследването на CALUX за ER α е изпитване на изпускане на лактат дехидрогеназа (LDH) в комбинация с качествена визуална инспекция на клетките (вж. допълнение 4.1) след излагане на изпитваните химикали. Въпреки това могат да се използва и други количествени методи за определяне на цитотоксичност (напр. колориметрично изследване базирано на тетразолиум (MTT) или биоизследване на CALUX за цитотоксичност). Като цяло, концентрации на изпитван химикал, които показват повече от 20% намаляване на клетъчната жизнеспособност се разглеждат като цитотоксични и поради това не могат да се използват за оценка на данни. По отношение на изследването за изпускане на LDH, концентрацията на изпитвания химикал се смята за цитотоксична, когато процентът на изпускане на LDH е по-висок от 120%.

Експозиция на изпитвания химикал и организация на плаката за изследването

36. След трипсиниране на конfluентните клетки в съда за култивиране, клетките се ре-суспендира в съотношение 1×10^5 клетки/ml в среда за изследване без съдържание на естроген. Сто μ l от ре-суспендираните клетки се поставят във вътрешните ямки на 96-ямкова микротитърна плака. Външните ямки се запълват с 200 μ l фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS) (вж. фигури 1 и 2). Поставените в плаката клетки се пред-инкубират за 24 часа в CO₂ инкубатор (5% CO₂, 37°C, 100% влажност).

37. След предварителната инкубация, плаките се преглеждат за видими признаци на цитотоксичност (вж. допълнение 4.1), замърсяване и конfluентност. Единствено плаките, които не показват цитотоксичност, замърсяване и са с минимум 85% конfluентност се използват за изпитване. Средата от вътрешните ямки се отстранява внимателно и се заменя с 200 µl среда за изследване без естроген, съдържаща подходящата серия на разреждане на референтните еталони, изпитваните химикали, положителните контроли, отрицателните контроли и контролите на разтворителя (таблица 5: проучвания на агонисти; Таблица 6: проучвания на антагонисти). Всички референтни еталони, изпитвани химикали, положителни контроли, отрицателни контроли и контроли на разтворителя се изпитват трикратно. На фигура 1 се вижда разположението на плаката при изпитването с агонисти. На фигура 2 се вижда разположението на плаката при изпитването с антагонисти. Разположението на плаката за предварителното скринингово изпитване и цялостното изпитване е идентично. За изпитването с антагонисти, всички вътрешни ямки, с изключение на ямките за контрола на носителя (VC), съдържат и фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17β-естрадиол ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M). Не бива да се забравя, че референтните еталони C8 и C4 следва да бъдат добавени към всяка ТС плака.

38. След експозиция на клетките на всички химикали, 96-ямковите микротитърни плаки следва да бъдат инкубирани за още 24 часа в инкубатор с CO₂ (5% CO₂, 37°C, 100% влажност).

Фигура 1: Разположение на ямките на 96-ямкови микротитърни плаки за предварителна проверка и оценяване на агонистичния ефект.

Плака 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А												
Б		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	ПК	
В		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	ПК	
Г		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	ПК	
Д		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
Е		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
Ж		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
З												

Следващи плаки

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А												
Б		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
В		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
Г		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
Д		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
Е		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
Ж		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
З												

C0 = разтворител на референтния еталон.

C(1-8) = серия разреждания (1-8, от ниска към висока концентрация) на референтния еталон.
 ПК = положителна контрола.
 NC = отрицателна контрола.
 TCx-(1-8) = разреждания (1-8, от ниска към висока концентрация) на изпитвания химикал за серията за предварителна проверка и оценяване на агонистичния ефект на изпитван химикал х.
 SC = контрол на разтворителя на изпитвания химикал (в оптималния вариант, същия разтворител като при C0, но може да е от друга партида).
 Сиви клетки: = Външните ямки, запълнени с 200 µl PBS.

Фигура 2: Разположение на ямките на 96-ямкови микротитърни плаки за предварителен скрининг за антагонисти и оценяване на антагонистичния ефект.

Плака 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А												
Б		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
В		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Г		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Д		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	ПК	
Е		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	ПК	
Ж		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	ПК	
З												

Следващи плаки

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А												
Б		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (макс.)	
В		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (макс.)	
Г		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (макс.)	
Д		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (макс.)	
Е		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (макс.)	
Ж		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (макс.)	
З												

C0 = разтворител на референтния еталон.
 C(1-8) = серия разреждания (1-8, от ниска към висока концентрация) на референтния еталон.
 NC = отрицателна контрола.
 ПК = положителна контрола.
 TCx-(1-8) = разреждания (1-8, от ниска към висока концентрация) на изпитвания химикал за серията за предварителна проверка и оценяване на агонистичния ефект на изпитвания химикал х.
 SC = контрол на разтворителя на изпитвания химикал (в оптималния вариант, същият разтворител като при C0, но може да е от друга партида).
 VC = контрол на носителя (контрол на разтворителя без фиксираната концентрация на референтния еталон за агонисти 17β-естрадиол).
 Сиви клетки: = Външните ямки, запълнени с 200 µl PBS.

Забележка: всички вътрешни ямки, с изключение на ямките за контрола на носителя (VC), съдържат и фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17β-естрадиол (3,0*10⁻¹² M)

Измерване на луминесценцията

39. Измерването на луминесценцията е описано подробно в протокола за изследване на агонисти и антагонисти (10). Средата от ямките следва да се отстрани и клетките да бъдат лизирани 24 часа след инкубация, за да се отворят клетъчните мембрани, което да позволи измерване на луциферазната активност.
40. Процедурата за измерване на луминесценцията изисква луцифометър, оборудван с 2 инжектора. Луциферазната реакция се активира с инжектирането на субстрата луциферин. Реакцията се спира с добавянето на 0,2 M NaOH. Спирането на реакцията предотвратява преноса на луминесценция от една ямка в друга.
41. Светлината, излъчена от всяка ямка се изразява в относителни светлинни единици (RLU) на ямка.

Предварителна скринингова серия

42. Резултатите от предскрининговия анализ се използват за определяне на оптимизираните стойности на кривата концентрация-обхват на изпитваните химикали за цялостното изпитване. Оценяването на резултатите от предскрининговия анализ и определянето на оптимизираните стойности на кривата концентрация-обхват на изпитваните химикали за цялостното изпитване са подробно описани в протокола за изследване на агонисти и антагонисти (10). Тук е представено кратко резюме на процедурите за определяне на обхвата на концентрацията на изпитваните химикали за изпитването на агонисти и антагонисти. Вж. таблици 5 и 6 за насоки относно постановката за серийно разреждане.

Избор на концентрации за оценка на агонистичните ефекти

43. По време на предварителната скринингова серия, изпитваните химикали следва да бъдат изпитани, като се използва серията от разреждания, описани в таблица 5 (за агонизъм) и 6 (за антагонизъм). Всички концентрации следва да бъдат изпитани трикратно, съобразно разположението на ямките в плаката, както е указано на фигура 1 (агонизъм) или 2 (антагонизъм).
44. Единствено резултатите от анализа, които изпълняват критериите за приемане (таблица 3) се разглеждат като валидни и могат да се използват за оценяване на отклика на изпитваните химикали. В случай че една или повече микротитърни плаки от една серия за анализ не изпълни критериите за приемане, съответните микротитърни плаки следва да бъдат анализирани повторно. В случай че първата плака, съдържаща пълната серия от разреждания на референтния еталон, не изпълни критериите за приемане, пълната серия за изпитване (6 плаки) трябва да бъде анализирана повторно.

45. Първоначалните обхвати на концентрацията на изпитваните химикали следва да бъдат коригирани и серията на предварителния скрининг следва да бъде повторена, ако:
- бъде забелязана цитотоксичност. Процедурата за предварителен скрининг следва да бъде повторена с по-ниски и нецитотоксични концентрации на изпитвания химикал.
 - предварителният скрининг на изпитвания химикал не покаже пълна крива доза-отклик, защото изпитаните концентрации генерират максимална индукция. Предварителната скринингова серия следва да бъде повторена, като се използват по-ниски концентрации на изпитвания химикал.
46. Когато се наблюдава валиден отклик, свързан с дозата, следва да бъде избрана (най-ниската) концентрация, при която се наблюдава максимална индукция и при която не се проявява цитотоксичност. Най-високата концентрация на изпитвания химикал, която ще бъде изпитвана в рамките на сериите за цялостно изпитване, следва да бъде 3 пъти по-голяма от тази избрана концентрация.
47. Следва да се подготви пълна серия на оптимизирано разреждане на изпитвания химикал, като се спазват стъпките за разреждане, описани в таблица 5, и се започне от най-високата концентрация, определена по-горе.
48. Изпитван химикал, който не предизвиква никакъв агонистичен ефект, следва да бъде изпитан в сериите за цялостно изпитване, като се започне от най-високата, нецитотоксична концентрация, определена по време на предварителното скриниране.

Избор на концентрации за оценка на антагонистичните ефекти

49. Единствено резултатите от анализа, които изпълняват критериите за приемане (таблица 4), се разглеждат като валидни и могат да се използват за оценяване на отклика на изпитваните химикали. В случай че една или повече микротитърни плаки от една серия за анализ не изпълни критериите за приемане, съответните микротитърни плаки следва да бъдат анализирани повторно. В случай че първата плака, съдържаща пълната серия от разреждания на референтния еталон, не изпълни критериите за приемане, пълната серия за изпитване (6 плаки) трябва да бъде анализирана повторно.
50. Първоначалните обхвати на концентрацията на изпитваните химикали следва да бъдат коригирани и серията на предварителния скрининг следва да бъде повторена, ако:
- бъде забелязана цитотоксичност. Процедурата за предварителен скрининг следва да бъде повторена с по-ниски и нецитотоксични концентрации на изпитвания химикал.
 - Предварителният скрининг на изпитвания химикал не покаже пълна крива доза-отклик, защото изпитаните концентрации генерират максимално потискане. Предварителният скрининг следва да бъде повторен, като се използват по-ниски концентрации на изпитвания химикал.

51. Когато се открие валиден отклик, свързан с дозата, следва да бъде избрана (най-ниската) концентрация, при която се наблюдава максимално потискане и при която не се проявява цитотоксичност. Най-високата концентрация на изпитвания химикал, която ще бъде изпитвана в рамките на сериите за цялостно изпитване, следва да бъде 3 пъти по-голяма от тази избрана концентрация.
52. Следва да се подготви пълна серия на оптимизирано разреждане на изпитвания химикал, като се спазват стъпките за разреждане, описани в таблица 6 и се започне от най-високата концентрация, определена по-горе.
53. Изпитван химикал, който не предизвиква никакви антагонистични ефекти, следва да бъде изпитан в сериите за цялостно изпитване, като се започне от най-високата, нецитотоксична концентрация, изпитана по време на предварителното скриниране.

Сериите на цялостно изпитване

54. След избора на оптимизираните обхвати на концентрацията, изпитваните химикали следва да бъдат изпитани цялостно, като се използва серията от разреждания, описани в таблици 5 (агонизъм) и 6 (антагонизъм). Всички концентрации следва да бъдат изпитани трикратно, съобразно разположението на ямките в плаката, както е указано на фигура 1 (агонизъм) или 2 (антагонизъм).
55. Единствено резултатите от анализа, които изпълняват критериите за приемане (таблица 3 и 4), се разглеждат като валидни и могат да се използват за оценяване на отклика на изпитваните химикали. В случай че една или повече микротитърни плаки от една серия за анализ не изпълни критериите за приемане, съответните микротитърни плаки следва да бъдат анализирани повторно. В случай че първата плака, съдържаща пълната серия от разреждания на референтния еталон, не изпълни критериите за приемане, пълната серия за изпитване (6 плаки) трябва да бъде анализирана повторно.

Таблица 5: Концентрации и разреждания на референтните еталони, контроли и изпитвани химикали, използвани за изпитване на агонисти

Референтен еталон 17 β -естрадиол конц. (M)		ТСх - предварителна скринингова серия разреждане		ТСх - серия на цялостно изпитване разреждане		Контроли конц. (M)	
C0	0	ТСх-1	10 000 000 x	ТСх-1	3 000 x	ПК	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	ТСх-2	1 000 000 x	ТСх-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	ТСх-3	100 000 x	ТСх-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	ТСх-4	10 000 x	ТСх-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	ТСх-5	1 000 x	ТСх-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	ТСх-6	100 x	ТСх-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	ТСх-7	10 x	ТСх-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻¹¹	ТСх-8	1 x	ТСх-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

ТСх - изпитван химикал х

ПК - положителна контрола (17 α -метилтестостерон)

НС - отрицателна контрола (кортикостерон)

С0 - контрол на разтворителя на референтния еталон

SC - контрол на разтворителя на изпитвания химикал

Таблица 6: Концентрации и разреждания на референтните еталони, контроли и изпитвани химикали, използвани за изпитване на антагонисти

Референтен еталон тамоксифен конц. (М)		ТСх - предварителна скринингова серия разреждане		ТСх - серия на цялостно изпитване разреждане		Контроли конц. (М)	
С0	0	ТСх-1	10 000 000 х	ТСх-1	3 000 х	ПК	1,0*10 ⁻⁰⁹
С1	3,0*10 ⁻⁰⁹	ТСх-2	1 000 000 х	ТСх-2	1 000 х	НС	1,0*10 ⁻⁰⁵
С2	1,0*10 ⁻⁰⁸	ТСх-3	100 000 х	ТСх-3	300 х	С0	0
С3	3,0*10 ⁻⁰⁸	ТСх-4	10 000 х	ТСх-4	100 х	SC	0
С4	1,0*10 ⁻⁰⁷	ТСх-5	1 000 х	ТСх-5	30 х	Добавен агонист конц. (М)	
С5	3,0*10 ⁻⁰⁷	ТСх-6	100 х	ТСх-6	10 х		
С6	1,0*10 ⁻⁰⁶	ТСх-7	10 х	ТСх-7	3 х		
С7	3,0*10 ⁻⁰⁶	ТСх-8	1 х	ТСх-8	1 х	17 β - естрадиол	3,0*10 ⁻¹²
С8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

ТСх - изпитван химикал х

ПК - положителна контрола (4-хидрокситамоксифен)

НС - отрицателна контрола (ресвератрол)

С0 - контрол на разтворителя на референтния еталон

SC - контрол на разтворителя на изпитвания химикал

VC - контрол на носителя (не съдържа фиксирана концентрация на референтния еталон за агонисти 17 β -естрадиол) (3,0*10⁻¹² М)

Събиране и анализ на данни

56. След сериите за предварителен скрининг и цялостно изпитване следва да бъдат определени стойностите на ЕС₁₀, ЕС₅₀, РС₁₀, РС₅₀ и максималната индукция (ТСх_{max}) на изпитвания химикал за изпитването на агонисти. За изпитването с антагонисти следва да се изчислят стойностите за IC₂₀, IC₅₀, РС₈₀, РС₅₀ и минималната индукция (ТСх_{min}). Графично представяне на тези параметри е дадено на фигура 3 (агонизъм) и 4 (антагонизъм). Необходимите параметри се изчисляват на базата на относителната индукция на всеки изпитван химикал (спрямо максималната индукция на референтния еталон (=100%)). За оценяването на данните следва да се използва нелинейна регресия (с променлив наклон, 4 параметъра), съгласно следното уравнение:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hill Slope)})}$$

Където:

X = Логаритъм от дозата или концентрацията

Y = отклик (относителна индукция (%))

Top = Максимална индукция (%)

Bottom = Минимална индукция (%)

LogEC₅₀ = Логаритъм на концентрацията, при която се наблюдава 50% от максималния отклик

HillSlope = Фактор на наклон на коефициента на Хил

57. Необработените данни от луминометъра, изразени като относителни светлинни единици (RLU), следва да се прехвърлят в електронната таблица за анализ на данни, предназначена за предварителния скрининг и цялостните анализи. Необработените данни следва да отговарят на критериите за приемливост, както са посочени в Таблица 3А и 3Б (агонизъм) или 4А и 4Б (антагонизъм). В случай, че необработените данни отговарят на критериите за приемливост, се извършват следните изчисления за определяне на необходимите параметри:

Агонизъм

- Изважда се средната стойност за RLU на референтния стандартен контролен разтвор от всички необработени данни от анализа на референтните еталони.
- Изважда се средната стойност на RLU за контролния разтвор на изпитвания химикал от всички необработени данни от анализа на изпитваните химикали.
- Изчислява се относителната индукция на всяка концентрация на референтния еталон. Определя се индукцията на най-високата концентрация на референтния еталон като 100%.
- Изчислява се относителната индукция на всяка концентрация на изпитвания химикал в сравнение с най-високата концентрация на референтния еталон, приета за 100%.
- Оценяват се резултатите от анализа след нелинейна регресия (променлив наклон, 4 параметъра).
- Определят се EC₅₀ и EC₁₀ на референтния еталон.
- Определят се EC₅₀ и EC₁₀ на изпитваните химикали.
- Определя се максималната относителна индукция на изпитвания химикал (TC_{max}).
- Определят се PC₁₀ и PC₅₀ на изпитваните химикали.

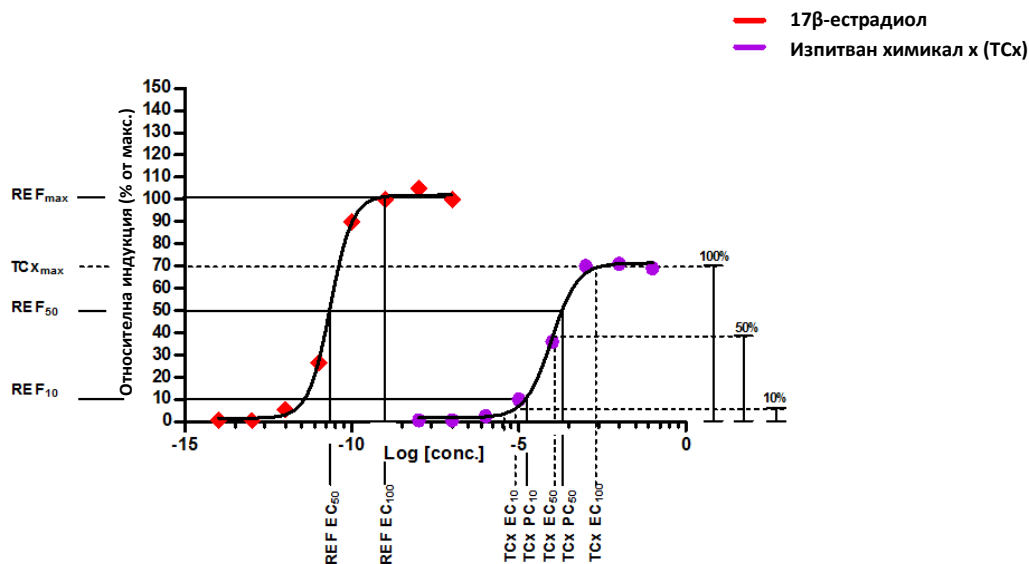
За някои изпитвани химикали цялата крива доза-отклик може да не бъде винаги налична, например поради проблеми с цитотоксичността или разтворимостта. Поради това EC₅₀, EC₁₀ и PC₅₀ не могат да бъдат определени. В такъв случай могат да се

определят само PC_{10} и TC_{max} .

Антагонизъм

- Средната стойност на RLU на най-високата концентрация на референтния еталон се изважда от всички необработени данни от анализа на референтните еталони.
- Средната стойност на RLU на най-високата концентрация на референтния еталон се изважда от всички необработени данни от анализа на изпитваните химикали.
- Изчислява се относителната индукция на всяка концентрация на референтния еталон. Определя се индукцията на най-ниската концентрация на референтния еталон като 100%.
- Изчислява се относителната индукция на всяка концентрация на изпитвания химикал в сравнение с най-ниската концентрация на референтния еталон, приета за 100%.
- Оценяват се резултатите от анализа след нелинейна регресия (променлив наклон, 4 параметъра).
- Определят се IC_{50} и IC_{20} на референтния еталон.
- Определят се IC_{50} и IC_{20} на изпитваните химикали.
- Определят се минималната относителна индукция на изпитвания химикал (TC_{min}).
- Определят се PC_{80} и PC_{50} на изпитваните химикали.

Фигура 3: Общ преглед на параметрите, определени в изследването с агонист



EC_{10} = концентрация на вещество, при която се наблюдава 10% от неговия максимален отклик.

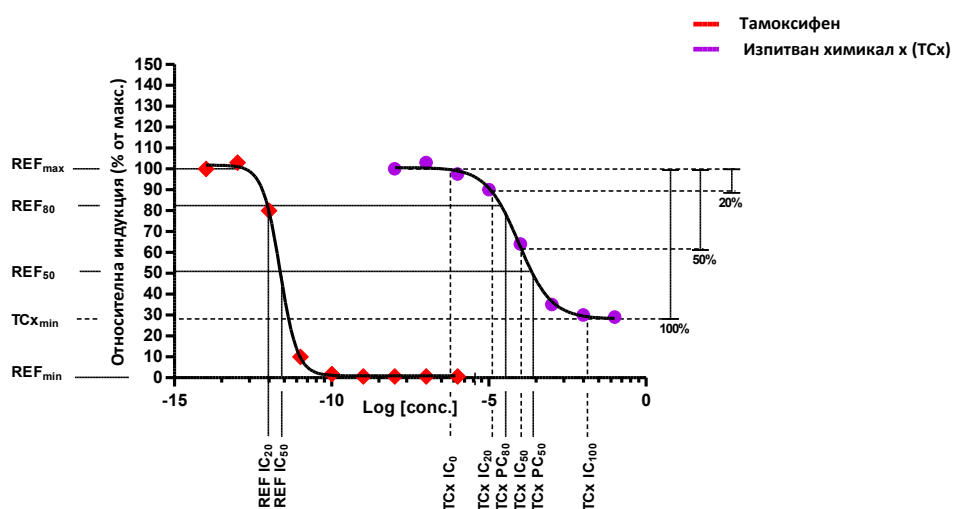
EC_{50} = концентрация на вещество, при която се наблюдава 50% от неговия максимален отклик.

PC_{10} = концентрация на изпитван химикал, при която неговият отклик е равен на EC_{10} на референтния еталон.

PC_{50} = концентрация на изпитван химикал, при която неговият отклик е равен на EC_{50} на референтния еталон.

TCx_{max} = максимална относителна индукция на изпитван химикал.

Фигура 4: Общ преглед на параметрите, определени в анализа на антагонист



IC_{20} = концентрация на веществото, при която се наблюдава 80% от неговия максимален отклик (20% инхибиране).

IC_{50} = концентрация на веществото, при която се наблюдава 50% от неговия максимален отклик (50% инхибиране).

PC_{80} = концентрация на изпитван химикал, при която неговият отклик е равен на IC_{20} на референтния стандарт.

PC_{50} = концентрация на изпитван химикал, при която неговият отклик е равен на IC_{50} на референтния стандарт.

TCx_{min} = минимална относителна индукция на изпитван химикал.

За някои изпитвани химикали цялата крива доза-отклик може да не бъде винаги налична, например поради проблеми с цитотоксичността или разтворимостта. Следователно IC_{50} , IC_{20} и PC_{50} не могат да бъдат определени. В такъв случай могат да се определят само PC_{20} и TC_{min} .

58. Резултатите следва да се базират на две (или три) независими серии. Ако две серии дават сравними и следователно възпроизводими резултати, не е необходимо да се извършва трета серия. За да са приемливи, резултатите следва:

- Да отговарят на критериите за приемливост (вж. параграфи 14-22 на критериите за приемливост),
- да са възпроизводими.

Критерии за тълкуване на данните

59. За тълкуване на данните и вземане на решение дали изпитван химикал се счита за положителен или отрицателен следва да се използват следните критерии:

Агонизъм

За всяка цялостна серия даден изпитван химикал се счита за **положителен** в случай, че:

- 1 TC_{max} е равна на или превишава 10% от максималния отклик на референтния стандарт (REF_{10}).
- 2 Поне 2 последователни концентрации на изпитвания химикал са равни на или превишават REF_{10} .

За всяка цялостна серия даден изпитван химикал се счита за **отрицателен** в случай, че:

- 1 TC_{max} не превишава 10% от максималния отклик на референтния стандарт (REF_{10}).
- 2 По-малко от 2 последователни концентрации на изпитвания химикал са равни на или превишават REF_{10} .

Антагонизъм

За всяка цялостна серия даден изпитван химикал се счита за **положителен** в случай, че:

- 1 TC_{min} е равна на или по-ниска от 80% от максималния отклик на референтния стандарт ($REF_{80} = 20\%$ инхибиране).
- 2 Поне 2 последователни концентрации на изпитвания химикал са равни на или по-ниски от REF_{80} .

За всяка цялостна серия даден изпитван химикал се счита за **отрицателен** в случай, че:

- 1 TC_{min} превишава 80% от максималния отклик на референтния стандарт ($REF_{80} = 20\%$ инхибиране).
- 2 По-малко от 2 концентрации на изпитвания химикал са равни на или по-ниски от REF_{80} .

60. За да се характеризира силата на положителния отклик на даден изпитван химикал, следва да се съобщи величината на ефекта (агонизъм: TC_{max} ; антагонизъм: TC_{min}) и

концентрацията, при която ефектът възниква (агонизъм: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; антагонизъм: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

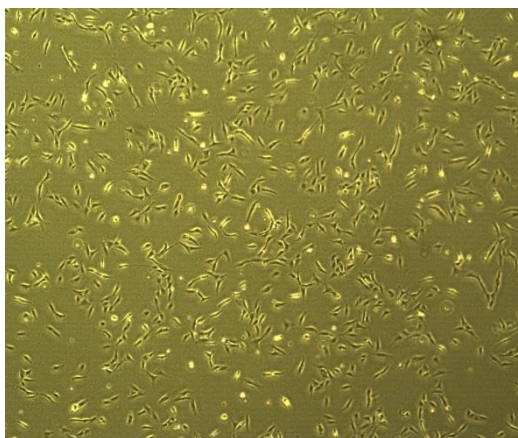
ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

61. Вижте точка 20 на „КОМПОНЕНТИ НА АНАЛИЗА ЕР ТА“

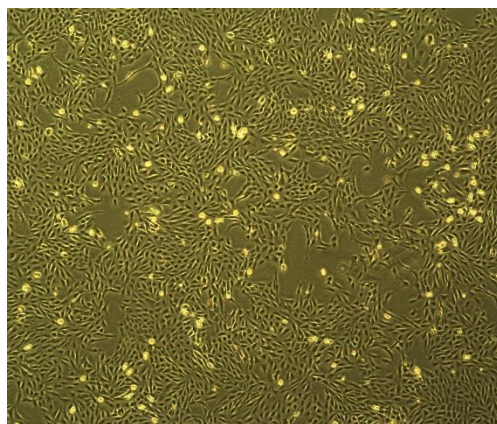
ЛИТЕРАТУРА

(4)

Допълнение 4.1: Визуална инспекция на клетъчната жизнеспособност

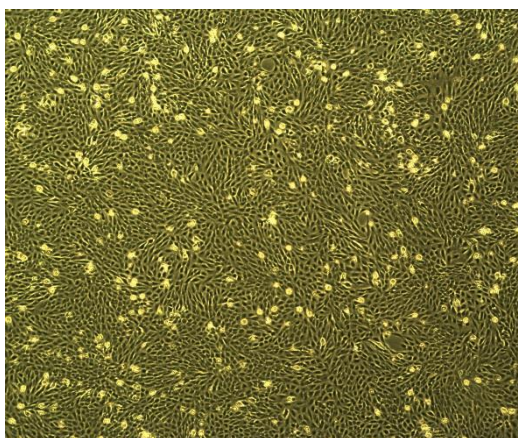


<5% конfluентност. Клетките са посадени току-що. 100% клетъчна жизнеспособност. Класификация: „няма цитотоксичност“



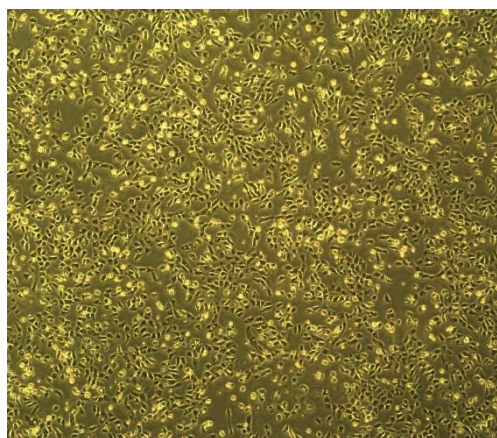
> 85% конfluентност. На този етап клетките се експонират на изпитвани химикали. > 95% клетъчна жизнеспособност.

Класификация: „няма цитотоксичност“

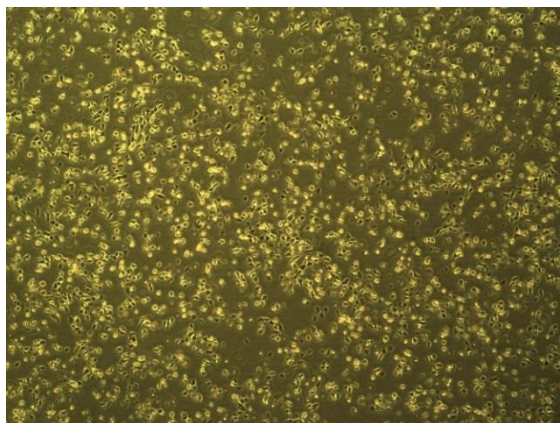


> 95% конfluентност. Клетките са гъсто разположени и започват да се разрастват. > 95% клетъчна жизнеспособност.

Класификация: „няма цитотоксичност“



< 25% клетъчна жизнеспособност. Клетките се отделят и контактът между клетките намалява. Клетките са кръгли. Класификация: „цитотоксичност“



< 5% клетъчна жизнеспособност. Клетките са напълно отделени и контактът между клетките е прекъснат. Клетките са кръгли. Класификация: „цитотоксичност“

Б.67 ИЗПИТВАНИЯ IN VITRO ЗА ГЕННИ МУТАЦИИ В КЛЕТКИ НА БОЗАЙНИЦИ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ГЕНА ТИМИДИН КИНАЗА

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване (МИ) е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП 490 (2016 г.). Методите за изпитване периодично се преразглеждат и ревизират в светлината на научния прогрес, регулаторните нужди и хуманното отношение към животните. Анализът на миши лимфом (MLA) и тестът ТК6, използващи локус на тимидин киназа (ТК), първоначално бяха включени в метода за изпитване Б.17. Впоследствие експертната работна група по MLA на Международните семинари относно изпитванията за генотоксичност (IWGT) разработи международно хармонизирани препоръки за критериите за приемливост на анализа и тълкуването на данните за MLA (1)(2)(3)(4)(5) и тези препоръки са включени в този нов метод на изпитване Б.67. Настоящият метод за изпитване е съставен за MLA и, тъй като използва и локус на ТК, теста ТК6. Докато MLA се използва широко за регулаторни цели, ТК6 се използва много по-рядко. Следва да се отбележи, че въпреки сходството между крайните точки, двете клетъчни линии не са взаимозаменяеми и някои регулаторни програми може основателно да изразят предпочитание към единия пред другия за дадена регулаторна употреба. Например валидирането на MLA демонстрира неговата уместност за откриване не само на генна мутация, но и на способността на даден изпитван химикал да предизвиква структурни хромозомни увреждания. Настоящият метод за изпитване е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на последните промени, направени в насоките за изпитване на ОИСП за генетична токсичност (6).
2. Целта на изпитванията *in vitro* за генни мутации в клетки на бозайници е откриването на генни мутации, предизвикани от химикали. Използваните в тези изпитвания клетъчни линии измерват правите мутации в репортерните гени, по-специално ендегенния ген на тимидин киназа (*TK* в човешки клетки и *Tk* в клетки на гризачи, наричани заедно в този метод на изпитване *TK*). Настоящият метод за изпитване е предназначен за употреба с две клетъчни линии: клетъчната линия L5178Y TK^{+/}-3.7.2C на миши лимфом (обикновено наричана L5178Y) и клетъчната линия ТК6 на човешки лимфобластод (обикновено наричана ТК6). Макар че двете клетъчни линии се различават по своя произход, клетъчен растеж, статус на p53, др., изпитванията за генни мутации *TK* могат да се провеждат по сходен начин и за двата вида клетки, както се описва в настоящия метод за изпитване.

3. Автозомната и хетерозиготната природа на гена тимидин киназа позволява откриването на жизнени колонии, иито клетки имат дефицит на ензима тимидин киназа след мутация от $TK^{+/-}$ до $TK^{-/-}$. Този дефицит може да е резултат от генетични събития, засягащи TK гена, включващ както генни мутации (точкови мутации, мутации с изместване на рамката, малки делеции, др.), така и хромозомни събития (големи делеции, хромозомни пренареждания и митотична рекомбинация). Последните събития се изразяват като загуба на хетерозиготност, която е често срещана генетична промяна на тумор-супресорните гени в човешката туморогенеза. На теория загубата на цялата хромозома, носеща гена TK , в резултат на увреждане на вретено и/или митотична недизюнкция може да бъде открита при MLA. Действително, комбинацията от цитогенетичния и молекулярния анализ ясно показва, че някои MLA TK мутанти са резултат от недизюнкция. Въпреки това доказателствата показват, че изпитванията за мутация на TK гена не са надежден начин за откриване на анеугени, когато се прилагат стандартни критерии за цитотоксичност (каквито са описани в този метод на изпитване) и поради това използването на тези изпитвания за откриване на анеугени не е подходящо (7)(8)(9).
4. В изпитванията за мутация на TK гена се генерират два отделни фенотипни класа на TK мутанти; нормално растящи мутанти, които растат със същата скорост като TK хетерозиготните клетки, и бавно растящи мутанти, които растат с удължено време на удвояване. Нормално растящите и бавно растящите мутанти се разпознават като голяма колония и малка колония мутанти в MLA и като рано появяваща се колония и късно появяваща се колония мутанти в $TK6$. Молекулярната и цитогенетичната природа на голямата и малката колония MLA мутанти е проучена подробно (8)(10)(11)(12)(13). Молекулярната и цитогенетичната природа на рано появяващите се и късно появяващите се $TK6$ мутанти също са изследвани задълбочено (14)(15)(16)(17). Бавно растящите мутанти и на двата вида клетки претърпяват генетично увреждане, което включва предполагаем(и) ген(и), регулиращ(и) растежа близо до TK локуса, което води до удължено време на удвояване и образуването на късно появяващи се или малки колонии (18). Индукцията на бавно растящи мутанти се свързва с химикали, които предизвикват големи структурни промени на хромозомно ниво. Клетките, чието увреждане не включва предполагаем(и) ген(и), регулиращ(и) растежа близо до TK локуса, растат със скорост, подобна на родителските клетки, и се превръщат в нормално растящи мутанти. Индукцията предимно на нормално растящи мутанти се свързва с химикали, които действат преди всичко като точкови мутагени. Следователно е важно да се преброят както бавно растящите, така и нормално растящите мутанти, за да се възстановят всички мутанти и да се осигури някаква представа за вида(овете) на увреждането

(мутагени спрямо кластогени), предизвикано от изпитвания химикал (10)(12)(18)(19).

5. Указанията за метода на изпитване са организирани така, че да предоставят обща информация, която се отнася и за MLA, и за ТК6, както и специфични указания за отделните изпитвания.
6. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

7. *In vitro* изпитванията по принцип изискват екзогенен източник на метаболитно активиране. Екзогенната система на метаболитно активиране не се възпроизвежда изцяло в условия *in vivo*.
8. Следва да се вземат мерки за избягване на условия, които биха довели до изкуствено възникнали положителни резултати (т.е. възможно взаимодействие със системата за изпитване), които не са причинени от прякото взаимодействие между изпитвания химикал и генетичния материал на клетката; такива условия включват промени в рН или осмолалитета, взаимодействие с компонентите на средата (20)(21) или прекомерно високи нива на цитотоксичност (22)(23)(24). Цитотоксичност, надвишаваща препоръчителните горни нива на цитотоксичност, както е определено в точка 28, се счита за прекомерна за MLA и ТК6. Освен това следва да се отбележи, че изпитвани химикали, които са аналози на тимидин или се държат като аналози на тимидин, може да увеличат честотата на мутации чрез селективен растеж на спонтанните фонові мутанти по време на третирането на клетките и изискват допълнителни методи на изпитване с цел адекватна оценка (25).
9. За произведени наноматериали може да е необходимо специфично адаптиране на настоящия метод за изпитване, но то не е описано в настоящия метод за изпитване.
10. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да предостави адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.
11. Дефицитът на мутантни клетки в активността на ензима тимидин киназа поради мутация на $TK^{+/-}$ до $TK^{-/-}$ е резистентен на цитостатичните ефекти на аналога на пиримидин трифлуортимидин (TFT). Клетките с достатъчна TK активност са чувствителни към TFT, което причинява инхибиране на клетъчния метаболизъм

и спира по-нататъшното клетъчно делене. Следователно мутантните клетки са способни да пролиферират в присъствието на TFT и да образуват видими колонии, докато клетките, съдържащи ензима ТК, не са.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

12. Клетките в суспензия се експонират на изпитвания химикал както със, така и без екзогенен източник на метаболитно активиране (вж. точка 19), за подходящ период от време (вж. точка 33), след което се субкултивират, за да се определи цитотоксичността и да се даде възможност за фенотипна експресия преди избора на мутант. Цитотоксичността се определя от относителния общ растеж (RTG – вж. точка 25) за MLA и от относителното оцеляване (RS – вж. точка 26) за ТК6. Третираните култури се поддържат в среда на растеж в продължение на достатъчен период от време, характерен за всеки клетъчен вид (вж. точка 37), за да се осигури почти оптимална фенотипна експресия на предизвиканите мутации. След фенотипната експресия честотата на мутантите се определя чрез посяване на предварително известни количества клетки в среда, съдържаща селективния агент, за да се открият мутантни колонии, и в среда без селективен агент, за да се определи ефикасността на клониране (жизнеспособността). След подходящ инкубационен период колонии се преброяват. Честотата на мутантите се изчислява въз основа на броя на мутантните колонии, коригиран с ефикасността на клониране към момента на подбора на мутантите.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Подготовка

Клетки

13. За MLA: Тъй като MLA е разработен и характеризирен с използване на сублинията $TK^{+/-}$ -3.7.2C на L5178Y клетки, тази специфична сублиния следва да се използва за MLA. Клетъчната линия L5178Y произлиза от метилхолантрен-индуциран тимусен лимфом от DBA-2 мишка (26). Clive и сътрудници третират L5178Y клетките (определени от Clive като $TK^{+/+}$ -3) с етилметанов сулфонат и изолират $TK^{-/-}$ (определен като $TK^{-/-}$ -3.7) клон с помощта на бромодеооксиуридин като селективен агент. От $TK^{-/-}$ клона се изолират спонтанен $TK^{+/-}$ клон (определен като $TK^{+/-}$ -3.7.2.) и субклон (определен като $TK^{+/-}$ -3.7.2C), които се характеризират за използване в MLA (27). Кариотипът на клетъчната линия е публикуван (28)(29)(30)(31). Модалният хромозомен брой е 40. Има една метацентрична хромозома (t12;13), която следва да се брои като една хромозома. Мишият TK локус е разположен в дисталния край на хромозома 11. Клетъчната линия L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C има мутации и в двата p53 алела и произвежда мутантен-p53 протеин (32) (33). p53 статусът на

клетъчната линия $TK^{+/-}$ -3.7.2C вероятно отговаря за способността на изпитването да открива мащабно увреждане (17).

14. За ТК6: ТК6 е човешка лимфобластоидна клетъчна линия. Родителската клетъчна линия е трансформирана от вируса Epstein-Barr клетъчна линия, WI-L2, която първоначално произлиза от 5-годишен индивид от мъжки пол с наследствена сфероцитоза. Първият изолиран клон, НН4, е мутагенизиран с ICR191 и се генерира *ТК* хетерозиготна клетъчна линия — ТК6 (34). ТК6 клетките са почти диплоидни и представителният кариотип е 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Човешкият *ТК* локус е разположен в дългото рамо на хромозома 17. ТК6 е p53-компетентна клетъчна линия, защото притежава див тип p53 секвенция и в двата алела и експресира само див тип p53 протеин (36).
15. И за MLA, и за ТК6, когато за пръв път се създава или попълва основен запас, се препоръчва лабораторията, провеждаща изпитването, да удостовери липсата на замърсяване с *микоплазма*, кариотипа на клетките или да оцвети клетките, които носят *ТК* локуса, и да провери времената за удвояване на популацията. Нормалната продължителност на клетъчния цикъл за клетките, използвана в лабораторията, провеждаща изпитването, следва да бъде установена и следва да съответства на публикуваните характеристики на клетките (16)(19)(37). Този основен запас следва да се съхранява при -150°C или по-ниска температура и да се използва за приготвяне на всички работни клетъчни запаси.
16. Или преди създаването на голям брой криоконсервирани работни запаси, или непосредствено преди употреба в даден опит културата може да се наложи да бъде пречистена от предварително съществуващи мутантни клетки [освен ако контролната честота на мутации (MF) на разтвора вече не е в рамките на приемливия диапазон — вж. таблица 2 за MLA)]. Това се извършва с помощта на метотрексат (аминоптерин) за избор на клетки с дефицит на ТК и добавяне на тимидин, хипоксантин и глицин (L5178Y) или 2'-деоксицитидин (ТК6) към културата, за да се гарантира оптимален растеж на ТК-компетентните клетки (19)(38)(39) и (40) за ТК6). Общи съвети относно добрата практика за поддържане на клетъчни култури, както и специфични съвети за L5178Y и ТК6 клетките, могат да бъдат намерени в (19)(31)(37)(39)(41). За лаборатории, които изискват основни клетъчни запаси за инициране на MLA или ТК6, или за получаване на нови основни клетъчни запаси, се предлага клетъчно хранилище с добре характеризирани клетки (37).

Среди и условия за отглеждане на културата

17. И за двете изпитвания следва да се използват подходящи среда за отглеждане и инкубационни условия (съдове за отглеждане, влажна атмосфера с 5 % CO_2 и температура на инкубиране от 37°C) за поддържане на културите. Клетъчните

култури следва винаги да се поддържат при условия, които осигуряват отглеждането им в логаритмична фаза. Особено важно е средите и условията за отглеждане на културите да се подберат така, че да осигуряват оптимален растеж на клетките по време на периода на експресия и клониране както за мутантни, така и за немутантни клетки. За MLA и ТК6 е важно също условията на отглеждане да гарантират оптимален растеж както на голяма/рано появяваща се колония, така и на малка/късно появяваща се колония на ТК мутанти. Още подробности за отглеждането, включително нуждата от правилно загряване на неактивиран конски серум, ако по време на селекцията се използва RPMI среда, могат да бъдат намерени в (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Приготвяне на културите

18. Размножават се клетки от изходни култури, посяват се в хранителна среда с такава гъстота, че суспензионните култури да продължават да растат експоненциално по време на периодите на третиране и експресия.

Метаболитно активиране

19. При използването на L5178Y и ТК6 клетки следва да се използват екзогенни метаболизиращи системи, тъй като те имат недостатъчен ендогенен капацитет за метаболизиране. Най-често използваната система, която се препоръчва по подразбиране, освен ако няма основание за друго, е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черен дроб на гризачи (обикновено плъхове), третирани с индуциращи ензими агенти като Aroclor 1254 (43) (44) (45) (46) или комбинация от фенобарбитал и β -нафтофлафон (46)(47)(48)(49)(50)(51). Последната комбинация не противоречи на Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители (52) и е доказано, че е също толкова ефективна, колкото Aroclor 1254, за индуцирането на оксидази със смесени функции (45)(46)(47)(48)(49). Фракцията S9 обикновено се използва в концентрации, вариращи от 1 до 2%, но може да се увеличи до 10% (v/v) в окончателната среда за изпитване. Изборът на типа и концентрацията на използваната екзогенна система за метаболитно активиране или метаболитен индуктор може да бъде повлиян от класа на изпитваните химикали.

Приготвяне на химикала за изпитване

20. Твърдите изпитвани химикали следва да се подготвят в подходящи разтворители и, ако е необходимо, да се разреждат преди третиране на клетките (вж. точка 21). Течните химикали за изпитване могат да се добавят директно в системата за изпитване и/или да се разреждат преди третирането на системата за изпитване. Газообразните или летливите изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани чрез подходящи изменения на стандартните протоколи, като

например третиране в запечатани съдове за отглеждане (53)(54)(55). Приготвянето на изпитвания химикал следва да се извърши непосредствено преди третирането, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ

Разтворители

21. Разтворителят следва да бъде избран с цел оптимизиране на разтворимостта на изпитвания химикал, без да се оказва негативно влияние върху извършването на изпитването, като например промяна на клетъчния растеж, засягане на целостта на изпитвания химикал, реакция със съдовете за отглеждане, нарушаване на системата за метаболитно активиране. Препоръчва се винаги, когато е възможно, най-напред да се разглежда възможността за използване на вода като разтворител (или среда за отглеждане). Добре утвърдени разтворители са вода или диметилсулфоксид. Като цяло органичните разтворители не следва да надвишават 1 % (об./об.), а водните разтворители (физиологичен разтвор или вода) не трябва да превишават 10 % (об./об.) в окончателната среда за третиране. Ако се използват различни от добре утвърдените разтворители (напр. етанол или ацетон), използването им следва да бъде подкрепено от данни за съвместимостта им с изпитваните химикали и системата за изпитване, както и за това, че не са генетично токсични при използваната концентрация. При липса на подкрепящи данни е важно да се добавят нетретирани контроли (виж Допълнение 1, „Определения“), за да се докаже, че избраният разтворител не предизвиква никакви неблагоприятни или мутагенни ефекти.

ИЗМЕРВАНЕ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТТА И ИЗБИРАНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИИ НА ТРЕТИРАНЕ

22. При определяне на най-високата концентрация на изпитвания химикал следва да се избягват концентрациите, които могат да доведат до изкуствено предизвикан положителен отклик, като например предизвикващите прекомерна цитотоксичност (вж. точка 28), утаяване (вж. точка 29) в средата за отглеждане или явни промени в рН или осмолалитета (вж. точка 8). Ако изпитваният химикал предизвиква явна промяна в рН на средата към момента на добавянето, рН може да бъде коригиран чрез буфериране на окончателната среда за третиране, за да се избегнат изкуствено предизвикани положителни резултати и да се поддържат подходящи условия за отглеждане.
23. Изборът на концентрация се основава на цитотоксичността и на други съображения (вж. точки 27—30). Въпреки че оценката на цитотоксичността в

първоначално изпитване може да бъде полезна за по-добро определяне на концентрациите, които ще се използват в главния опит, първоначалното изпитване не се изисква. Въпреки че се извършва първоначална оценка на цитотоксичността, измерването на цитотоксичността за всяка култура все още се изисква в основния експеримент. Ако се провежда опит за определяне на обхвата, той следва да обхваща широк диапазон на концентрации и може или да се прекрати в ден 1 след третиране, или да продължи с експресия на 2-я ден и до избор на мутант (ако изглежда, че използваните концентрации са подходящи).

24. Цитотоксичността следва да се определя за всяка отделна изпитвана и контролна култура: методите за MLA (2) и ТК6 (15) са определени от международно приета практика.
25. И за двете версии на MLA с агар и микроямка: цитотоксичността следва да се оценява с помощта на относителен общ растеж (RTG), който първоначално е определен от Clive и Spector през 1975 г. (2). Това измерване включва относителния растеж на суспензията (RSG: изпитвана култура спрямо контрола на разтворител) по време на третиране на клетките, времето на експресия и относителната ефикасност на клониране (RCE: изпитвана култура спрямо контрола на разтворител) към момента на избор на мутанти (2). следва да се отбележи, че RSG включва всички загуби на клетки, възникващи в изпитваната култура по време на третиране (вж. Допълнение 2 за формулите).
26. За ТК6: Цитотоксичността следва да се оценява с използване на относителна преживяемост (RS), т.е. ефикасността на клониране на клетки, които са посетили непосредствено след третирането, с корекция за всички загуби на клетки по време на третирането, въз основа на броя на клетките, в сравнение с отрицателната контрола (на която е присвоена стойност 100 % за оцеляване) (вж. Допълнение 2 за формулата).
27. следва да бъдат оценени най-малко четири концентрации на изпитване (без да се включват контролата на разтворителя и положителните контроли), които отговарят на критериите за приемливост (подходяща цитотоксичност, брой на клетки и т.н.). Използването на култури с едно повторение е препоръчително, но за всяка изпитвана концентрация може да се използват култури или без повторение, или с повторения. Резултатите, получени за култури с повторения при дадена концентрация, следва да се докладват отделно, но могат да бъдат обобщени за анализа на данните (55). За изпитваните химикали, показващи слаба цитотоксичност, или не показващи цитотоксичност, обичайно са подходящи приблизително 2 до 3-кратни концентрационни интервали. Там, където се среща цитотоксичност, избраните концентрации следва да обхващат диапазона на цитотоксичност от стойността, при която се получава

цитотоксичност, както е описано в точка 28, до концентрации, при които е налице умерена, слаба или нулева цитотоксичност. Много изпитвани химикали показват стръмни криви на концентрация-отклик и за да се обхване целият диапазон на цитотоксичност, или да се проучи подробно връзката концентрация-отклик, може да е необходимо да се използват по-близко разположени концентрации и повече от четири концентрации, по-специално в ситуации, при които се изисква повтаряне на опита (вж. точка 70). Използването на повече от 4 концентрации може да бъде особено важно при използване на култури без повторение.

28. Ако максималната концентрация се базира на цитотоксичност, най-високата концентрация следва да цели постигане на между 20 и 10% RTG за MLA и между 20 и 10% RS за ТК6 (точка 67).
29. За малко разтворимите изпитвани химикали, които не са цитотоксични при концентрации, по-ниски от най-ниската неразтворима концентрация, най-високата анализирана концентрация трябва да предизвиква помътняване или утайка, видима с невъоръжено око или с помощта на инвертен микроскоп в края на третирането с изпитвания химикал. Дори ако цитотоксичността се наблюдава над най-ниската концентрация на неразтворимост, препоръчително е да се извърши изпитване само при една концентрация, която предизвиква помътняване или е с видима утайка, тъй като от утайката могат да се получат изкуствено предизвикани въздействия. Тъй като MLA и ТК6 използват суспензионни култури, необходимо е особено внимание, за да се гарантира, че утайката не пречи на провеждането на изпитването. Определянето на разтворимостта в средата за отглеждане преди опита може също да е полезно.
30. Ако не се наблюдава утайка или ограничаваща цитотоксичност, най-високата изпитвана концентрация следва да отговаря на 10 mM, 2 mg/ml или 2 µl/ml, която от стойностите е най-ниска (57)(58). Когато изпитваният химикал не е с определен състав, например вещество с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали [т.е. химични вещества с непознат или променлив състав (UVCB)] (5), екстракти от околната среда и други, може да е необходимо най-високата концентрация да е по-висока (напр. 5 mg/ml), при липсата на достатъчна цитотоксичност, за да се увеличи концентрацията на всеки от компонентите. Следва да се отбележи обаче, че тези изисквания могат да се различават по отношение на фармацевтични продукти за хуманна употреба (59).

Контроли

31. За всяко опитно условие следва да се включат паралелни отрицателни контроли (вж. точка 21), състоящи се само от разтворител в средата за третиране, с които се работи по същия начин, както с третираните култури.
32. Паралелни положителни контроли са необходими за доказване на способността на лабораторията да идентифицира мутагени при условията на използвания протокол на изпитването, ефективността на екзогенната система за метаболитно активиране (когато е приложимо) и за демонстриране на адекватно откриване както на малки/късно появяващи се, така и на големи/рано появяващи се *ТК* мутанти. Примери за положителни контроли са дадени в таблица 1 по-долу. Могат да бъдат използвани алтернативни вещества за положителни контроли, ако това е обосновано. Тъй като *in vitro* изпитванията на клетки от бозайници за генетична токсичност са достатъчно стандартизирани за краткотрайни третираня (3–4 часа), извършвани едновременно със и без метаболитно активиране с използване на същата продължителност на третиране, използването на положителни контроли може да се ограничи до мутаген, изискващ метаболитно активиране. В този случай откликът на тази положителна контрола без повторение ще докаже както активността на дадена система за метаболитно активиране, така и способността на изпитваната система за генериране на отклик. Ако се използва, дълготрайното третиране (т.е. 24 часа без S9) следва въпреки това да има собствена положителна контрола, тъй като продължителността на третиране ще се различава от тази на изпитването, което използва метаболитно активиране. Всяка положителна контрола следва да се използва при една или повече концентрации, които се очаква да породят възпроизводими и откриваеми увеличения спрямо фона, за да се докаже чувствителността на системата за изпитване, и откликът не следва да се компрометира от цитотоксичност, надхвърляща границите, определени в настоящия метод за изпитване (вж. точка 28).

Таблица 1: Препоръчителни референтни вещества за оценка на пригодността на лабораторията и за подбор на положителни контроли

Категория	Вещество	CAS №
1. Мутагени, активни без метаболитно активиране		
Метиллов метансулфонат	66-27-3	
Митомицин С	50-07-7	
4-нитрохинолин-N-оксид	56-57-5	
2. Мутагени, изискващи метаболитно активиране		
Бензо(а)пирен	50-32-8	
Циклофосфамид (монохидрат)	50-18-0 (6055-19-2)	

7,12-диметилбензантрацен	57-97-6
3-метилхолантрен	56-49-5

ПРОЦЕДУРА

Третиране с изпитвания химикал

33. Пролифериращите клетки се третират с изпитвания химикал при наличието и в отсъствието на система за метаболитно активиране. Експозицията следва да е за подходящ период от време (обикновено 3—4 часа е достатъчно). Следва да се отбележи обаче, че тези изисквания могат да се различават по отношение на фармацевтични продукти за хуманна употреба (59). За MLA, в случаите, когато краткотрайното третиране води до отрицателни резултати и има информация, която предполага нуждата от по-дълго третиране [напр. нуклеозидни аналози, слабо разтворими химикали, (5)(59)], следва да се обмисли провеждане на изпитването с по-дълго третиране, т.е 24 часа без S9.
34. Минималният брой клетки, използвани за всяка изпитвана (контролна и третирана) култура на всеки етап от изпитването, следва да се базира на честотата на спонтанните мутации. Общото указание е да се третират и прехвърлят достатъчно клетки във всяка опитна култура, така че да се поддържат поне 10, а в идеалния случай 100 спонтанни мутации, във всички фази на изпитването (третиране, фенотипна експресия и мутантен избор) (56).
35. За MLA препоръчителната приемлива честота на спонтанни мутации е между $35-140 \times 10^{-6}$ (за версия с агар) и $50-170 \times 10^{-6}$ (за версия с микроямки) (вж. Таблица 2). За наличието на поне 10, а в идеалния случай 100 спонтанни мутации, оцеляващи след третиране, за всяка изпитвана култура, е необходимо да се третират поне 6×10^6 клетки. Третирането на такъв брой клетки и поддържането на достатъчно клетки по време на експресия и клониране за мутантен избор осигурява достатъчен брой спонтанни мутации (10 или повече) по време на всички фази на опита, дори за култури, третирани при концентрации, които водят до 90% цитотоксичност (както е измерено от 10% RTG) (19)(38)(39).
36. За ТК6 честотата на спонтанните мутации като цяло е между 2 и 10×10^{-6} . За наличието на поне 10 спонтанни мутации, оцеляващи след третиране, за всяка изпитвана култура, е необходимо да се третират поне 20×10^6 клетки. Третирането на такъв брой клетки осигурява достатъчен брой спонтанни мутации (10 или повече) дори за култури, третирани при концентрации, които причиняват 90% цитотоксичност по време на третиране (10% RS). Освен това

достатъчен брой клетки следва да бъдат култивирани по време на периода на експресия и да бъдат посетени за избор на мутант (60).

Време на фенотипна експресия и измерване на цитотоксичност и честотата на мутации

37. В края на периода на третиране клетките се култивират за определено време, за да се позволи почти оптимална фенотипна експресия на новите индуцирани мутации; специфични за всяка клетъчна линия. За MLA периодът на фенотипна експресия е 2 дни. За ТК6 периодът на фенотипна експресия е 3—4 дни. Ако се използва 24-часово третиране, периодът на експресия започва след края на третирането.
38. По време на периода на фенотипна експресия клетките се преброяват на ежедневна база. За MLA ежедневният брой клетки се използва за изчисляване на ежедневния растеж на суспензията (SG). След 2-дневния период на експресия клетките се суспендират в среда със и без селективно вещество за определяне съответно на броя на мутантите (плаки за селекция) и за ефикасност на клониране (плаки за жизнеспособност). За MLA има два в еднаква степен приемливи методи за клониране на мутантна селекция; единият използва мек агар, а другият използва течна среда в 96-ямкови плаки (19) (38) (39). Клонирането при ТК6 се провежда с използване на течна среда и 96-ямкови плаки (16).
39. Трифлуоротимидин (TFT) е единственото препоръчително селективно вещество за *ТК* мутанти (61).
40. За MLA плаките с агар и плаките с микроямки се преброяват след 10—12 дни инкубация. За ТК6 колонии в плаките с микроямки се оценяват след 10—14 дни за рано появили се мутанти. За възстановяване на бавно растящите (късно появяващите се) ТК6 мутанти е необходимо повторно посяване на клетките в хранителна среда с TFT след преброяване на рано появилите се мутанти, след което плаките се инкубират допълнително още 7—10 дни (62). Вж. в точки 42 и 44 обсъждане, отнасящо се за преброяването на бавно и нормално растящи *ТК* мутанти.
41. Съответните изчисления за двете изпитвания, включващи двата метода (агар и микроямки) за MLA са дадени в Допълнение 2. За методите с агар за MLA колонии се преброяват и броят на мутантните колонии се коригира с ефикасността на клониране за изчисляване на MF. За версията с микроямки на MLA и ТК6 ефикасността на клониране и за двете плаки — за селекция и ефикасност на клониране — се определя според разпределението на Поасон (63). MF се изчислява от тези две ефикасности на клониране.

Характеризиране на мутантна колония

42. За MLA, ако изпитваният химикал е положителен (вж. точки 62-63), характеризиране на колонията по размер на колонията или растеж следва да се извърши за поне една от изпитваните култури (обикновено най-високата приемлива положителна концентрация) и за отрицателните и положителните контроли. Ако изпитваният химикал е отрицателен (вж. точка 64), характеризирането на мутантната колония следва да се извърши за отрицателните и положителните контроли. При метода с микроямки на MLA за малки колонии мутанти се определят тези, които обхващат по-малко от 25% от диаметъра на ямката, а за големи тези, които обхващат повече от 25% от диаметъра на ямката. При метода с агар се използва автоматичен брояч на колонии за преброяване на мутантните колонии и определяне на размера на колония. Подходите за определяне на размера на колония са описани подробно в литературата (19)(38)(40). Характеризиране на колонията на отрицателната и положителната контрола е необходимо, за да се демонстрира, че проучванията са проведени адекватно.
43. Изпитваният химикал не може да се определи като отрицателен, ако мутанти и от голямата, и от малката колонии не се откриват адекватно в положителната контрола. Характеризирането на колония може да се използва за осигуряване на обща информация относно способността на изпитвания химикал да причинява точкови мутации и/или хромозомни събития (точка 4).
44. ТК6: Нормално растящите и бавно растящите мутанти се разграничават по разликата във времето на инкубация (вж. точка 40). За ТК6 обикновено се оценяват и рано, и късно появяващите се мутанти за всички култури, включително отрицателните и положителните контроли. Характеризиране на колонията на отрицателната и положителната контрола е необходимо, за да се демонстрира, че проучванията са проведени адекватно. Изпитваният химикал не може да се определи като отрицателен, ако и рано появяващите се, и късно появяващите се мутанти не се откриват адекватно в положителната контрола. Характеризирането на колония може да се използва за осигуряване на обща информация относно способността на изпитвания химикал да причинява точкови мутации и/или хромозомни събития (точка 4).

Пригодност на лабораторията

45. За да се натрупа достатъчно опит по отношение на изпитването преди използването му за рутинно изпитване, лабораторията следва да е извършила поредица опити с референтни положителни вещества, действащи чрез различни механизми (най-малко по едно със и едно без метаболитно активиране, избрани от веществата, изброени в таблица 1) и различни отрицателни контроли

(включително нетретираните култури и различни разтворители/носители). Положителният и отрицателният отклик при тези контроли следва да съответства на литературните източници. Това изискване не се прилага за лаборатории, които имат опит, т.е. които разполагат с налична база данни за предходни периоди, както е определено в точки 47-50. За MLA стойностите, получени за положителните и отрицателните контроли, следва да съответстват на препоръките на IWGT (вж. Таблица 2).

46. Изборът на вещества за положителни контроли (вж. Таблица 1) следва да се изследва с краткотрайно и дълготрайно третиране (ако се използва дълготрайно третиране) при отсъствие на метаболитно активиране, и с краткотрайно третиране в присъствие на метаболитно активиране, за да се докаже пригодността за откриване на мутагенни химикали, да се определи ефективността на системата за метаболитно активиране и да се докаже целесъобразността на условията за растеж на клетките по време на третирането, фенотипната експресия и избора на мутанти, и на процедурите за оценяване. Следва да бъде избран обхват от концентрации на веществата от подбора така, че да се получават възпроизводими и свързани с концентрацията увеличения над фоновите стойности с цел да се демонстрират чувствителността и динамичният обхват на системата за изпитване.

Данни за контролите за предходни периоди

47. Лабораторията следва да установи:

- Размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди,
- Размах и разпределение при отрицателните (без третиране и за разтворител) контроли от предходни периоди.

48. При първото придобиване на данни за разпределението на отрицателните контроли за предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да съответстват на публикуваните данни за контролите. С добавянето на повече опитни данни към разпределението на контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на 95% от контролните граници на това разпределение (64)(65).

49. Базата данни с отрицателни контроли от предходни периоди на лабораторията следва първоначално да се създаде с минимум 10 опита, но е за предпочитане тя да се състои най-малко от 20 опита, проведени при сравними опитни условия. Лабораториите следва да използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (X-bar) (65)), за определяне на варирането на данните за положителните и отрицателните контроли и за доказване, че методологията е „под контрол“ в

тяхната лаборатория (66). Допълнителни подробности и препоръки за създаването и използването на данни за предходни периоди може да се намерят в литературата (64).

50. Данните за отрицателните контроли следва да се състоят от честоти на мутантите от култури без повторение или — за предпочитане — с повторения, както е описано в точка 27. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди. Когато данните за отрицателни контроли попадат извън 95%-та контролна граница, те могат да са приемливи за включване в разпределението на контролите за предходни периоди, при условие че тези данни не се отклоняват екстремално и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. точка 49), както и доказателства за липса на техническа или човешка грешка.
51. Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на съгласуваността на данните със съществуващите бази данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди. Всички значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Представяне на резултатите

52. Представянето на данни за MLA и ТК6 следва да включва както за третираните, така и за контролните култури, необходимите данни за изчисляването на цитотоксичност (съответно RTG или RS) и честотата на мутации, както е описано по-долу.
53. За MLA данните за отделна култура следва да включват RSG, RTG, ефикасността на клониране към момента на избор на мутант и броя на мутантните колонии (за версията с агар) или броя на празните ямки (за версията с микроямки). MF следва да се изрази като брой мутантни клетки на милион оцеляващи клетки. Ако откликът е положителен, следва да се предоставят MF на малка и голяма колония (и/или процентът на общата MF) за поне една концентрация на изпитвания химикал (обикновено най-високата положителна концентрация) и за отрицателните и положителните контроли. В случай на отрицателен отклик следва да се предоставят MF на малка и голяма колония за отрицателната контрола и положителната контрола.

54. За ТК6 данните за отделна култура следва да включват RS, ефикасността на клониране към момента на избор на мутант и броя на празните ямки за рано появяващите се и късно появяващите се мутанти. MF следва да се изрази като брой мутантни клетки на брой брой оцеляващи клетки и следва да включва общата MF, както и MF (и/или процентът на общата MF) на рано и късно появяващите се мутанти.

Критерии за приемливост

55. И за MLA, и за ТК6 следва да са спазени следните критерии, преди да се определят общите резултати за специфичен изпитван химикал:

- Изследвани са две опитни условия (т.е. краткотрайно третиране със и без метаболитно активиране – вж. точка 33), освен ако едно от тях не е довело до положителни резултати.
- Следва да има достатъчен брой клетки и концентрации за анализ (вж. точки 27, 34-36).
- Критериите за избор на най-високата концентрация са съвместими с тези, описани в точки 28-30.

Критерии за приемливост за отрицателни и положителни контроли

56. Анализът на голямо количество MLA данни на експертната работна група по MLA на IWGT доведе до международен консенсус относно специфичните критерии за приемливост за MLA (1)(2)(3)(4)(5). Следователно този метод на изпитване предоставя специфични препоръки за определяне на приемливостта на отрицателните и положителните контроли и за оценка на резултатите за отделно вещество при MLA. За ТК6 има много по-малка база данни, която не е оценена от работна група.

57. За MLA, всеки опит следва да се оценява според това дали нетретираната контрола/контролата на разтворителя отговаря на критериите за приемливост на работната група по MLA на IWGT ((4) и Таблица 2 по-долу) за: (1) MF (имайте предвид, че приемливите MF на IWGT са различни за версиите с агар и микроямки на MLA), (2) ефикасност на клониране (CE) към момента на избор на мутант и (3) растеж на суспензията (SG) за контролния разтворител (вж. Допълнение 2 за формулите).

Таблица 2: Критерии за приемливост за MLA

Параметър	Метод с мек агар	Метод с микроямки
Честота на мутациите	35 – 140 x 10 ⁻⁶	50 – 170 x10 ⁻⁶

Ефикасност на клониране	65 – 120%	65 – 120%
Растеж на суспензията	8 – 32 пъти (3-4-часово третиране) 32 – 180 пъти (24-часово третиране, ако се провежда)	8 – 32 пъти (3-4-часово третиране) 32 – 180 пъти (24-часово третиране, ако се провежда)

58. За MLA всяко изпитване следва да се оценява и за това дали положителната(ите) контрола(и) отговаря(т) на поне един от следните два критерия за приемливост, разработени от работната група на IWGT:

- Положителната контрола следва да демонстрира абсолютно увеличение на общата MF, което означава увеличение над спонтанната фонова MF [индуцирана MF (IMF)] с поне 300×10^{-6} . Поне 40% от IMF следва да се отразява в MF на малката колония.
- Положителната контрола има увеличение на MF в малката колония с поне 150×10^{-6} над това, наблюдавано в паралелната нетретирана контрола/контролата на разтворителя (IMF на малка колония 150×10^{-6}).

59. За ТК6 изпитването е приемливо, ако паралелната отрицателна контрола се смята за приемлива за добавяне към базата данни за предходни периоди на лабораторията за отрицателните контроли, както е описано в точки 48-49. Освен това паралелните положителни контроли (вж. точка 32) следва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за предходни периоди за положителни контроли, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола.

60. И за двете изпитвания горната граница на цитотоксичност, наблюдавана в културата за положителна контрола, следва да е същата, като тази на опитните култури. Това означава, че RTG/RS следва да е не по-малко от 10%. Достатъчно е да се използва една концентрация (или една от концентрациите на културите за положителна контрола, ако се използва повече от една концентрация), за да се демонстрира, че критериите за приемливост за положителната контрола са удовлетворени. Освен това MF на положителната контрола следва да е в рамките на приемливия диапазон, определен за лабораторията.

Оценка и тълкуване на резултатите

61. За MLA експертната група по миши лимфом на IWGT е провела значителна работа по отношение на биологичната относимост и критериите за положителен отклик (4). Следователно този метод на изпитване предоставя специфични препоръки за тълкуването на резултатите MLA за изпитвания химикал (вж.

точки 62-64). За ТК6 има много по-малка база данни, която не е оценена от работна група. Поради това препоръките за тълкуването на данните за ТК6 имат по-общ характер (вж. точки 65-66). И за двете изпитвания се прилагат допълнителни препоръки (вж. точки 67-71).

MLA

62. Препоръчва се подход за определяне на положителните и отрицателните отговори, за да се гарантира, че увеличената MF е биологично относима. Вместо статистически анализ, какъвто обикновено се използва за други изпитвания, той разчита на използването на предварително определена предизвикана честота на мутации (т.е. увеличение на MF над паралелна контрола) и определя глобалния фактор за оценка (GEF), който се базира на анализа на разпределението на данните за MF за отрицателните контроли, получени от участващи лаборатории (4). За версията с агар на MLA GEF е 90×10^{-6} , а за версията с микроямки на MLA GEF е 126×10^{-6} .
63. При условие че всички критерии за приемливост за изпълнени, даден изпитван химикал се счита за ясно положителен, ако, при всяко от изследваните опитни условия (вж. точка 33), увеличението на MF над паралелния фон превишава GEF и увеличението е свързано с концентрацията (напр. използване на трендов тест). След това изпитваният химикал се счита за способен да индуцира мутация в тази система за изпитване.
64. При условие че всички критерии за приемливост за изпълнени, даден изпитван химикал се счита за ясно отрицателен, ако, при всички изследвани опитни условия (вж. точка 33), няма свързано с концентрацията увеличение или, ако има увеличение на MF, то не превишава GEF. След това изпитваният химикал се счита за неспособен да индуцира мутация в тази система за изпитване.

ТК6

65. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако в някое от опитните условия (вж. точка 33):
- при поне една от изпитваните концентрации се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола
 - увеличението е свързано с концентрацията, когато се оценява с подходящ трендов тест (вж. точка 33)
 - някой от тези резултати е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Пуасон с граница за контрол 95 %). вж. точка 48).

Когато са изпълнени всички тези критерии се смята, че изпитваният химикал може да индуцира мутация в тази система за изпитване. Препоръки за най-подходящите статистически методи може да се намерят в литературата (66)(67).

66. При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия (вж. точка 33):

- в никоя от изпитваните концентрации не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- няма свързано с концентрацията увеличение, когато се оценява с подходящ трендов тест
- всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граница за контрол 95 %); вж. точка 48).

След това изпитваният химикал се счита за неспособен да индуцира мутация в тази система за изпитване.

И за MLA, и за ТК6:

67. Ако максималната концентрация се базира на цитотоксичност, най-високата концентрация следва да цели постигане на между 20 и 10% RTG/RS. Постигнат е консенсус, че е необходимо внимание при тълкуване на положителни резултати, които се откриват само между 20 и 10% RTG/RS, и резултатът не следва да се счита за положителен, ако увеличението на MF възниква само при или под 10% RTG/RS (ако се оценява) (2)(59).

68. Има някои обстоятелства, при които допълнителна информация може да помогне за определянето дали даден изпитван химикал не е мутагенен, когато няма култура, показваща RTG стойност между 10-20% RTG/RS. Тези ситуации са изложени както следва: (1) Няма доказателства за мутагенност (напр. няма отклик на доза, няма честоти на мутации над наблюдаваните при паралелната отрицателна контрола или фоновите диапазони за предходни периоди и т.н.) в поредица от точки с данни в обхвата от 100% до 20% RTG/RS и има поне една точка с данни между 20 и 25% RTG/RS. (2) Няма доказателства за мутагенност (напр. няма отклик на доза, няма честоти на мутации над наблюдаваните при паралелната отрицателна контрола или фоновите диапазони за предходни периоди, др.) в поредица от точки с данни от 100% до 25% RTG/RS и има отрицателна точка от данни малко под 10% RTG/RS. И в двете ситуации може да се направи заключение, че изпитваният химикал е отрицателен.

69. Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

70. В случаите, когато откликът не е нито ясно отрицателен, нито ясно положителен, както е описано по-горе, и/или с цел подпомагане на определянето на биологичната относимост на даден резултат, данните следва да се оценяват чрез експертна оценка и/или чрез допълнителни изследвания. Извършването на повторен опит с възможност за използване на променени опитни условия [напр. интервал на концентрация за увеличаване на вероятността за получаване на точки с данни в рамките на 10-20% диапазон на RTG/RS, използване на други условия на метаболитно активиране (т.е. концентрация на S9 или производ на S9) и продължителност на третиране] може да се окаже полезно.
71. В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати. Поради това за отклика на изпитвания химикал следва да се заключи, че е неясен (тълкуван като еднакво вероятно да е положителен или отрицателен).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

72. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител:

- обосновка на избора на разтворител;
- процентно съдържание на разтворителя в окончателната среда за отглеждане.

Клетки:

За първични култури в лабораторията:

- вид и източник на клетките и история в изпитвателната лаборатория;
- кариотипни характеристики и/или модален брой на хромозомите;
- методи за поддържане на клетъчните култури;
- отсъствие на микоплазма;
- времена за удвояване на клетките.

Условия на изпитването:

- обосновка за избора на концентрации и броя на клетъчните култури; включително напр. данни за цитотоксичност и ограничения на разтворимостта;
- състав на средите, концентрация на CO₂, влажност;
- концентрация на изпитвания химикал, изразена като крайна концентрация в средата за отглеждане (напр. µg или mg/ml или mM от среда за отглеждане);
- концентрация (и/или обем) на разтворителя и изпитвания химикал, добавени в средата за отглеждане;
- температура на инкубиране;
- време на инкубиране;
- времетраене на третирането;
- гъстота на клетките по време на третиране;
- тип и състав на системата за метаболитно активиране (източник на S9, метод на приготвяне на S9 микс, концентрация или обем на S9 микс и S9 в окончателната среда за отглеждане, контрол на качеството на S9);
- вещества за положителни и отрицателни контроли, крайни концентрации за всяко условие на третиране;
- продължителност на периода на експресия (в т.ч. брой на посетите клетки и субкултури и графици на подхранване, ако е уместно);
- идентификационни данни на селективния агент и неговата концентрация;
- за MLA следва да се посочи използваната версия (агар или микроямки)

- критерии за приемливост на изпитванията;
- използвани методи за преброяване на жизнеспособните и мутиралите клетки;
- Методи, използвани за измерване на цитотоксичността;
- всякаква допълнителна информация, относима към цитотоксичността и използвания метод;
- продължителност на инкубационните периоди след посяване;
- определение колонии с какъв размер и от какъв вид се вземат предвид (включително критерии за „малки“ и „големи“ колонии, както е подходящо);
- критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или неясни;
- методи, използвани за определяне на рН, осмолалитет, ако са извършени и утайка, ако е подходящо.

Резултати:

- брой на третираните клетки и брой на клетките, подложени на субкултура за всяка култура;
- параметри на токсичност (RTG за MLA и RS за TK6);
- признаци на утаяване и час на определяне;
- броят клетки, посети в среда със селективен агент и в среда без селективен агент;
- брой на колонии в среда без селективен агент и брой на резистентни колонии в среда със селективен агент, и свързаните честоти на мутации;
- определяне на размера на колония за отрицателните и положителните контроли и, ако изпитваният химикал е положителен, поне една концентрация, и свързаните честоти на мутации;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- данни от паралелни отрицателни (разтворител) и положителни контроли (концентрации и разтворители);
- данни за предходни периоди за отрицателни (разтворител) и положителни контроли (концентрации и разтворители) с диапазони, средни стойности и стандартни отклонения; брой изпитвания въз основа на които се базират контролите за предходни периоди;
- статистически анализи (за единични култури и обобщени повторения, ако е подходящо) и р-стойности, ако има такива; и за MLA – оценка на GEF.

Обсъждане на резултатите

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Анеутен: всеки химикал или процес, който води до анеуплодия в клетките или организмите чрез взаимодействие с компонентите на митотичния и мейотичния цикъл на клетъчно делене.

Анеуплоидия: всяко отклонение от обичайния диплоиден (или хаплоиден) брой на хромозомите с една или повече от една хромозома, но не и с цял набор (или набори) от хромозоми (полиплоидия).

Мутагени, предизвикващи заместване на двойка бази: химикали, предизвикващи заместване на двойка бази в ДНК.

Химикал: Вещество или смес.

Ефикасност на клониране: Процентът на клетките, посети с ниска гъстота, които са в състояние да растат в колония, която може да бъде преброена.

Кластоген: всеки химикал или процес, който причинява структурни аберации от хромозомен тип в популации от клетки или организми.

Цитотоксичност: за изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, цитотоксичността се определя като намаляване на относителния общ растеж (RTG) или относителното оцеляване (RS) съответно за MLA и TK6.

Мутация в поколението напред: генна мутация от родителския тип в мутанта, от която възниква изменение или загуба на ензимна активност или на функцията на кодирания белтък.

Мутагени с изместване на рамката на разчитане: химикали, които причиняват добавяне или делеция на една или много двойки бази в молекулата на ДНК.

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждане на ДНК или хромозоми, включително разкъсвания на ДНК, адукти, пренареждания, мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички типове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.

Митотична рекомбинация: рекомбинация, по време на митозата, между хомоложни хроматиди, евентуално водеща до индуциране на разкъсвания на двойната спирала на ДНК или до загуба на хетерозиготност.

Мутагенен: води до наследствена промяна на ДНК последователност(и) на базовите двойки в гени, или на структурата на хромозоми (хромозомни аберации).

Честота на мутации (MF): Броят на наблюдаваните мутантни клетки, разделен на

броя на жизнеспособните клетки.

Време на фенотипно изразяване: Времето след третирането, през което генетичното изменение се фиксира в генома, и всички съществуващи преди това генетични продукти се изчерпват до момента, в който фенотипният признак се променя.

Относителна преживяемост (RS): RS се използва като мярка за свързана с третирането цитотоксичност в ТК6. RS е ефикасността на клониране (CE) на клетки, които са посетени непосредствено след третирането, с корекция за всяка загуба на клетки по време на третирането, в сравнение с ефикасността на клониране на отрицателната контрола.

Относителен растеж на суспензия (RSG): за MLA — относителният общ двудневен растеж на суспензията на изпитваната култура в сравнение с общия двудневен растеж на суспензията на отрицателната контрола/контролата на разтворителя (Clive and Spector, 1975). RSG следва да включва относителния растеж на изпитваната култура в сравнение с отрицателната/на разтворителя контрола по време на периода на третиране.

Относителен общ растеж (RTG): RTG се използва като мярка за свързана с третирането цитотоксичност при MLA. Той е мярка за относителен (спрямо контролния носител) растеж на изпитвани култури по време на фазите на третиране, двудневна експресия и избор на клониран мутант на изпитването. RSG на всяка изпитвана култура се умножава на относителната ефикасност на клониране на изпитваната култура към момента на избор на мутант и се изразява по отношение на ефикасността на клониране на отрицателната/на разтворителя контрола (Clive and Spector, 1975).

S9 фракции от черен дроб: супернатант от хомогенат на черен дроб след центрофугиране при 9000 g, т.е. необработен екстракт от черен дроб

S9 микс: микс от S9 фракцията от черен дроб и кофактори, необходими за метаболитна ензимна активност.

Растеж на суспензия (SG): Увеличението в пъти на броя на клетките по време на фазите на третиране и експресия на MLA. SG се изчислява чрез умножаване на увеличението в пъти в ден 1 по увеличението в пъти в ден 2 за краткотрайно (3 или 4 часа) третиране. Ако се използва 24-часово третиране, SG е увеличението в пъти по време на 24-часовото третиране, умножено на увеличението в пъти в дните 1 и 2 на експресия.

Контрола на разтворител : общ термин за определяне на контролните култури, които са само на разтворителя, който се използва за разтваряне на изпитвания химикал.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Нетретирани контроли: култури, които не се третират (т.е. без изпитвания химикал и без разтворител), но се обработват паралелно и по същия начин като културите, които се третират с изпитвания химикал.

Допълнение 2

ФОРМУЛИ

Цитотоксичност

И за двете версии на MLA (с агар и микроямка)

Цитотоксичността се определя като относителния общ растеж (RTG), който включва относителния растеж на суспензията (RSG) по време на 2-дневния период на експресия, и относителната ефикасност на клониране (RCE), получена към момента на избор на мутант. RTG, RSG и RCE се изразяват като проценти.

Изчисляване на RSG: Растеж на суспензията едно (SG₁) е скоростта на растеж между ден 0 и ден 1 (клетъчна концентрация в ден 1 / клетъчна концентрация в ден 0), растеж на суспензията две (SG₂) е скоростта на растеж между ден 1 и ден 2 (клетъчна концентрация в ден 2 / клетъчна концентрация в ден 1). RSG е общият SG (SG₁ x SG₂) за третираната култура в сравнение с нетретираната/на разтворителя контрола. Т.е.: $RSG = [SG_{1(изпитван)} \times SG_{2(изпитван)}] / [SG_{1(контрола)} \times SG_{2(контрола)}]$ SG₁ следва да се изчисли от първоначалната клетъчна концентрация, използвана в началото на третирането на клетките. Значенията за всяка диференциална цитотоксичност, която възниква в изпитваната(ите) култура(и) по време на третирането на клетките.

RCE е относителната ефикасност на клониране на изпитваната култура в сравнение с относителната ефикасност на клониране на нетретираната/на разтворителя контрола, получена към момента на избор на мутант.

Относителен общ растеж (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Относително оцеляване (RS):

Цитотоксичността се оценява чрез относително оцеляване, т.е. ефикасността на клониране (CE) на клетките, посети непосредствено след третирането, коригирана за всяка загуба на клетки по време на третирането, в сравнение с ефикасността на клониране при отрицателните контроли (на които е присвоена стойност 100% за оцеляване). Коригирането за загуба на клетки по време на третиране може да се изчисли като:

$$\text{Коригирана CE} = CE \times \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS за култура, третирана с изпитван химикал, се изчислява като:

$$RS = \frac{\text{Adjusted CE in the treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Честота на мутации и за MLA, и за ТК6

Честотата на мутации (MF) е ефикасността на клониране на мутантни колонии в селективна среда (CE_M), коригирана с ефикасността на клониране в неселективна среда към момента на избор на мутант (CE_V). Т.е. $MF = CE_M / CE_V$. Изчисляването на тези две ефикасности на клониране се описва по-долу за методите на клониране с агар и микроямки.

Версия на MLA с агар: Във версията на MLA с мек агар броят на колонииите върху плаката за избор на мутант (C_M) и броят на колонииите върху плаката за неселектирани или ефикасност на клониране (брой жизнеспособни) (C_V) се получава чрез директно преброяване на клонингите. Когато се посяват 600 клетки в плаки за ефикасност на клониране (CE) за избор на мутант (CE_M) и плаки за неселектирани или ефикасност на клониране (брой жизнеспособни) (CE_V) и 3×10^6 клетки се използват за избор на мутант,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Версия на MLA и ТК6 с микроямки: Във версията на MLA с микроямки C_M и C_V се определят като продукта от общия брой микроямки (TW) и вероятния брой колонии на ямка (P) в плаките с микроямки.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

От нулевата точка на разпределението на Поасон (Furth et al., 1981), P се получава чрез

$$P = -\ln(EW / TW),$$

където EW е броят на празни ямки, а TW е общият брой ямки. Следователно:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

За версията на MLA с микроямки честотите на малки и големи колонии мутанти се изчислява по същия начин, с използване на съответния брой празни ямки за малки и големи колонии.

За ТК6 честотите на малки и големи колонии мутанти се базират на рано появяващите се и късно появяващите се мутанти.

Б.68 *IN VITRO* МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА КРАТКОТРАЙНА ЕКСПОЗИЦИЯ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА i) ХИМИКАЛИ, ПРИЧИНЯВАЩИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ И ii) ХИМИКАЛИ, НЕИЗИСКВАЩИ КЛАСИФИЦИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 491 (2017). Методът за изпитване на краткотрайна експозиция (STE) е *in vitro* метод, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на опасността и етикетиране на химикали (вещества и смеси), които причиняват сериозно увреждане на очите, както и на тези, които не изискват класифициране за дразнещо действие върху очите или сериозно увреждане на очите, определено от Глобалната хармонизирана система на Организацията на обединените нации (ООН) за класифициране и етикетиране на химикали (GHS) (1) и Регламента на Европейския съюз (ЕС) 1272/2008 за класифициране, етикетиране и опаковане на вещества и смеси (CLP)¹.
2. В продължение на много години потенциалната опасност за очите на химикали е оценявана предимно с използване на *in vivo* изпитване върху очи на зайци (TM B.5 (8), еквивалентен на ОИСП TG 405). Понастоящем е общоприето, че в обозримо бъдеще, нито едно алтернативно изпитване *in vitro* за дразнене на очите няма да е в състояние да замени напълно изпитването *in vivo* върху очи на зайци при прогнозирането в целия спектър на сериозно увреждане на очите/дразнене на очите, за различните класове химикали. При все това стратегическите комбинации от няколко алтернативни методи на изпитване в рамките на стратегия за (поетапно) изпитване може да са в състояние напълно да заменят изпитването върху очи на зайци (2). Подходът „отгоре надолу“ е създаден да се използва, когато въз основа на съществуваща информация за даден химикал се очаква висок потенциал за дразнещо действие или причиняване на сериозно увреждане на очите. От друга страна, подходът „отдолу нагоре“ е създаден да се използва, когато въз основа на съществуващата

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

информация за даден химикал се очаква, че няма да причини дразнене на очите, което да изисква класифициране. Въпреки че методът за изпитване STE не се смята като заместващ напълно изпитването *in vivo* върху очи на зайци, той е подходящ за използване като част от стратегия за поетапно изпитване за регулаторно класифициране и етикетиране, като подхода „отгоре надолу“/„отдолу нагоре“, за идентифициране без последващо изпитване на (i) химикали, причиняващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН/CLP) и (ii) химикали (с изключение на силно летливи вещества и всички твърди химикали, различни от повърхностноактивни вещества), които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите (без категория по GHS на ООН/CLP) (1)(2). Независимо от това, даден химикал, за който не се прогнозира, че причинява сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН/CLP) или е без категория по GHS на ООН/CLP (не причинява сериозно увреждане на очите или дразнене на очите) с метода за изпитване STE, изисква допълнително изпитване за определяне на окончателно класифициране. Освен това е необходима консултация със съответните регулаторни органи, преди да се използва STE в подход „отдолу нагоре“ в схеми на класифициране, различни от тези на GHS на ООН/CLP. Изборът на най-подходящия метод за изпитване и използването на този метод за изпитване следва да се разглежда в контекста на насоките на ОИСП за интегрирани подходи за изпитване и оценка на сериозно увреждане на очите и дразнене на очите (14).

3. Целта на настоящия метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалната опасност за очите на даден изпитван химикал въз основа на неговата способност да предизвиква цитотоксичност при метода на изпитване с краткотрайна експозиция. Цитотоксичният ефект на химикали върху епителните клетки на роговицата е важен механизъм на действие (МОА), водещ до увреждане на роговичния епител и дразнене на очите. Клетъчната жизнеспособност в метода за изпитване STE се оценява чрез количествено измерване, след екстракция от клетки, на синя формаза нова сол, която се произвежда от живите клетки чрез ензимно преобразуване на виталния оцветител МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид), известен също като тиазолил синьо тетразолиев бромид (3). Получената клетъчна жизнеспособност се сравнява с контролата на разтворителя (относителна жизнеспособност) и се използва за оценка на потенциалната опасност за очите на изпитвания химикал. Даден изпитван химикал се класифицира като категория 1 по GHS на ООН/CLP, когато и двете концентрации от 5% и 0,05% водят до клетъчна жизнеспособност по-малка или равна на ($\leq$) 70%. От друга страна, даден химикал се прогнозира, че е без

категория по GHS на ООН/CLP, когато и двете концентрации от 5% и 0,05% водят до клетъчна жизнеспособност по-голяма от (>) 70%.

4. Терминът „изпитван химикал“ се използва в този метод за изпитване за обозначаване на това, какво се изпитва, и не е свързан с приложимостта на метода за изпитване STE за изпитване на вещества и/или смеси. Определенията са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Този метод за изпитване се базира на протокола, разработен от Као Corporation (4), който е предмет на две различни изпитвания за валидиране: едно от валидиращия комитет на Японското дружество за алтернативни методи за изпитване върху животни (JSAAE) (5) и друго от Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) (6). Извършена е партньорска проверка от NICEATM/ICCVAM въз основа на докладите от изпитването за валидиране и предходен преглед на документите на метода за изпитване (7).
6. Когато се използва за идентифициране на химикали (вещества и смеси), предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН/CLP) (1), получените с метода на изпитване STE данни за 125 химикали (включващи и вещества, и смеси) са с обща точност от 83% (104/125), процент неверни положителни резултати 1% (1/86) и процент неверни отрицателни резултати 51% (20/39) в сравнение с данните от метода за изпитване *in vivo* върху очи на зайци (7). Полученият процент неверни отрицателни резултати в настоящия контекст не е от критично значение, тъй като всички изпитвани химикали, които предизвикват клетъчна жизнеспособност $\leq 70\%$ при 5% концентрация и $> 70\%$ при 0,05% концентрация, трябва да бъдат впоследствие изпитвани с други достатъчно валидирани *in vitro* методи за изпитване или, като последна възможност, с изпитването *in vivo* върху очи на зайци, в зависимост от регулаторните изисквания и в съответствие със стратегията за последователно изпитване и подходите за тежест на доказателства, които понастоящем се препоръчват (1) (8). Изпитвани са предимно вещества с една съставка, въпреки че има ограничени данни и за изпитването на смеси. Независимо от това методът за изпитване е технически приложим за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси. Въпреки това, преди използването на настоящия метод за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Методът за изпитване STE не проявява други специфични недостатъци, когато се използва за идентифициране на изпитвани химикали от категория 1 по GHS

на ООН/CLP. Изследователите биха могли да разгледат възможността за използване на този метод за изпитвани химикали, при които клетъчна жизнеспособност $\leq 70\%$ при 5% и 0,05% концентрация следва да се приеме като показателна за отклик, предизвикващ сериозно увреждане на очите, който следва да бъде класифициран като категория 1 по GHS на ООН/CLP без допълнително изпитване.

7. Когато се използва за идентифициране на химикали (вещества и смеси), не изискващи класифициране за дразнене на очите и сериозно увреждане на очите (т.е. без категория по GHS на ООН/CLP), получените с метода за изпитване STE данни за 130 химикали (включващи и вещества, и смеси), са с обща точност от 85% (110/130), процент неверни отрицателни резултати 12% (9/73) и процент неверни положителни резултати 19% (11/57) в сравнение с изпитването *in vivo* върху очи на зайци (7). Ако силно летливи вещества и твърди вещества, различни от повърхностноактивни вещества, се изключат от набора данни, общата точност се подобрява до 90% (92/102), процентът неверни отрицателни резултати до 2% (1/54) и процентът неверни положителни резултати до 19% (9/48) (7). Вследствие на това потенциалните недостатъци на метода за изпитване на STE, когато се използва за идентифициране на изпитвани химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите и сериозно увреждане на очите (без категория по GHS на ООН/Регламент CLP), са с висок процент неверни отрицателни резултати за i) силно летливи вещества с налягане на пари над 6 kPa и ii) твърди химикали (вещества и смеси), различни от повърхностноактивни вещества, и смеси, съставени само от повърхностноактивни вещества. Тези химикали се изключват от областта на приложимост на метода за изпитване STE (7).
8. Освен химикалите, споменати в точки 6 и 7, методът за изпитване STE генерира набор от данни, който съдържа и вътрешни данни за 40 смеси, които, при сравнение с изпитването *in vivo* на Draize за действие върху очите, демонстрират точност от 88% (35/40), процент неверни положителни резултати 50% (5/10) и процент неверни отрицателни резултати 0% (0/30) за прогнозиране на смеси, които не изискват класифициране по системите за класификация GHS на ООН/CLP (9). Следователно методът за изпитване STE може да се прилага за идентифициране на смеси без категория по GHS на ООН/CLP при подход „отдолу нагоре“, с изключение на твърди смеси, различни от тези, които са съставени само от повърхностноактивни вещества, като разширение на неговото ограничение по отношение на твърди вещества. Освен това смесите, съдържащи вещества с налягане на пари по-високо от 6kPa, следва да се оценяват внимателно, за да се избегнат потенциални класифицирания на по-ниско ниво, и следва да се обосновават за всеки конкретен случай.

9. Методът за изпитване STE не може да се използва за идентифициране на изпитвани химикали, които следва да бъдат класифицирани като категория 2 по GHS на ООН/CLP или категория 2А (дразнещи очите) по GHS на ООН/CLP, или 2В (леко дразнещи очите), поради значителния брой химикали от категория 1 по GHS на ООН/CLP, класифицирани на по-ниско ниво като категория 2, 2А или 2В или химикали без категория по GHS на ООН/CLP, класифицирани на по-високо ниво като 2, 2А или 2В (7). За тази цел може да се изисква допълнително изпитване с друг подходящ метод.
10. Методът за изпитване STE е подходящ за изпитвани химикали, които се разтварят или суспендират равномерно в продължение на поне 5 минути във физиологичен разтвор, 5% диметил сулфоксид (DMSO) във физиологичен разтвор или минерално масло. Методът за изпитване STE не е подходящ за изпитвани химикали, които са неразтворими или не могат да се суспендират равномерно в продължение на поне 5 минути във физиологичен разтвор, 5% DMSO във физиологичен разтвор или минерално масло. Използването на минерално масло в метода за изпитване STE е възможно поради краткотрайната експозиция. Следователно методът за изпитване STE е подходящ за прогнозиране на потенциалната опасност за очите на разтворими във вода изпитвани химикали (*напр.* мастни алкохоли с дълга верига или кетони), при условие че те са смесими с поне един от трите предложени по-горе разтворители (4).
11. Терминът „изпитван химикал“ се използва в този метод за изпитване за обозначаване на това, какво се изпитва ¹¹, и не е свързан с приложимостта на метода за изпитване STE за изпитване на вещества и/или смеси.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

12. Методът за изпитване STE е базиращ се на цитотоксичност *in vitro* анализ, който се извършва върху сливащ се монослой на клетки от роговица на зайци на Statens Seruminstitut (SIRC), култивирани в 96-ямякова микроплака от поликарбонат (4). След петминутна експозиция на даден изпитван химикал цитотоксичността се измерва количествено като относителната жизнеспособност на SIRC клетките с използване на анализа MTT (4). Намалена

¹¹ През юни 2013 г. на съвместно заседание се постигна съгласие, че сега за новите и актуализираните методи за изпитване следва да се прилага по-последователна употреба на термина „изпитван химикал“, описващ какво се изпитва, където е възможно.

клетъчна жизнеспособност се използва за прогнозиране на потенциални нежелани ефекти, водещи до очно увреждане.

13. Съобщава се, че 80% от даден разтвор, капнат в око на зайци, се екскретира чрез конюнктивалния сак в рамките на три до четири минути, докато повече от 80% от даден разтвор, капнат в човешко око, се екскретира в рамките на една до две минути (10). Методът за изпитване STE опитва да апроксимира тези времена на експозиция и да използва цитотоксичността като крайна точка за оценка на степента на увреждане на SIRC клетките след петминутна експозиция на изпитвания химикал.

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

14. Преди рутинната употреба на метода за изпитване STE, описан в настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да демонстрират техническа компетентност чрез правилно класифициране на единадесетте вещества, препоръчани в Таблица 1. Тези вещества са избрани да представят целия диапазон на отговори за сериозно увреждане на очите или дразнене на очите въз основа на резултати от *in vivo* изпитвания върху очи на зайци (TG 405) и системата за класифициране GHS на ООН/CLP (1). Другите критерии за избор включват, че веществата следва да са достъпни на пазара, че следва да има налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че висококачествените *in vitro* данни от метода за изпитване STE следва да са налични (3). При ситуации, в които дадено вписано вещество не е налично или когато е оправдано може да се използва друго вещество, за което има налични адекватни *in vivo* и *in vitro* референтни данни, при условие че се прилагат същите критерии, които са описани тук.

Таблица 1: Списък на опитните вещества

Вещество	CAS №	Химичен клас ¹	Агрегатно състояние	<i>In Vivo</i> GHS на ООН/CLP кат. ²	Разтворител в изпитване STE	STE GHS по ООН/CLP кат.
Бензалкониев хлорид (10%, воден разтвор)	8001-54-5	Ониево съединение	Течност	Категория 1	Физиологичен разтвор	Категория 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Етер	Течност	Категория 1	Физиологичен разтвор	Категория 1
Кисело червено 92	18472-87-2	Хетероциклично съединение Бромно съединение	Твърд	Категория 1	Физиологичен разтвор	Категория 1

		Хлорирано съединение				
Натриев хидроксид	1310-73-2	Основи; Неорганичен химикал	Твърд	Категория 1 ³	Физиологичен разтвор	Категория 1
Бутиролактон	96-48-0	Лактон; Хетероциклично съединение	Течност	Категория 2A (Категория 2 по CLP)	Физиологичен разтвор	Не може да се направи прогноза
1-октанол	111-87-5	Алкохол	Течност	Категория 2A/B ⁴ (категория 2 по CLP)	Минерално масло	Не може да се направи прогноза
Циклопентанол	96-41-3	Алкохол; Въглеродород (цикличен)	Течност	Категория 2A/B ⁵ (категория 2 по CLP)	Физиологичен разтвор	Не може да се направи прогноза
2-етоксиетил ацетат	111-15-9	Алкохол; Етер	Течност	Без категория	Физиологичен разтвор	Без категория
Додекан	112-40-3	Въглеродород (ацикличен)	Течност	Без категория	Минерално масло	Без категория
Метилизобутилкетон	108-10-1	Кетон	Течност	Без категория	Минерално масло	Без категория
n,n-диметилгуанидин сулфат	598-65-2	Амидин; Сярно съединение	Твърд	Без категория	Физиологичен разтвор	Без категория

Съкращения: CAS RN = Номер в регистъра на Химическата реферативна служба

¹Химичните класове са определени с използване на информация, получена от предишни публикации на NICEATM и, ако не е налична, с използване на медицински предметни рубрики на Националната медицинска библиотека на САЩ (MeSH[®]) (чрез ChemIDplus[®] [Национална медицинска библиотека], достъпна на адрес <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) и структурни определения, направени от NICEATM.

²Въз основа на резултати от изпитването *in vivo* върху очи на зайци (ОИСП TG 405) и с използване на GHS на ООН/CLP (1).

³Класифицирането като кат.1 се базира на потенциала за корозия на кожата на 100% натриев хидроксид (изброен като опитен химикал с потенциал за корозия на кожата в ОИСП OECD TG 435) и критериите за категория 1 по GHS на ООН/CLP (1).

⁴Класифицирането като 2A или 2B зависи от тълкуването на критерия по GHS на ООН за разграничаване на тези две категории, т.е. 2 от 6 спрямо 4 от 6 животни с ефекти в ден 7 са необходими за класифициране като категория 2A. Наборът от данни *in vivo* включва 2 проучвания, всяко с 3 животни. В едното проучване две от три животни показват ефект в ден 7, което оправдава класифициране като категория 2A (11), докато във второто проучване всички крайни точки при всички три животни се възстановяват до оценка нула до ден 7, което оправдава класифициране като категория 2B (12).

⁵Класифицирането като 2A или 2B зависи от тълкуването на критерия по GHS на ООН за разграничаване на тези две категории, т.е. 1 от 3 спрямо 2 от 3 животни с ефекти в ден 7 са необходими за класифициране като категория 2A. Проучването *in vivo* включва 3 животни. Всички крайни точки освен непрозрачност на роговицата и зачервяване на конюнктивата при едно животно се възстановяват до оценка нула до ден 7 или по-рано. Едно от животните, което не се възстанови напълно до ден 7, имаше оценка 1 за непрозрачност на роговицата и , за зачервяване на конюнктивата (в ден 7), и се възстанови напълно в ден 14 (11).

ПРОЦЕДУРА

Приготвяне на клетъчния монослой

15. За провеждане на метода за изпитване STE следва да се използва клетъчната линия на роговица от зайци SIRC. Препоръчва се SIRC клетките да се получат от добре квалифицирана клетъчна банка, като CCL60 от Американската колекция на типови култури.
16. SIRC клетките се култивират при 37°C, 5% CO₂ и влажна атмосфера в съд за култивиране, съдържащ среда за отглеждане, която се състои от минимална основна среда на Eagle (MEM), допълнена с 10% фетален говежди серум (FBS), 2 mM L-глутамин, 50–100 единици/ml пеницилин и 50–100 µg/ml стрептомицин. Клетките, които са се слели в съда за култивиране, следва да се разделят с използване на разтвор на трипсин-етилендиаминтетраоцетна киселина, със или без използване на прибор за остъргване на клетки. Клетките се размножават (напр. 2 до 3 преминавания) в съд за култивиране, преди да бъдат използвани за рутинно изпитване, и следва да преминат през не повече от 25 преминавания след размразяване.
17. След това клетките, които са готови за изпитването STE, се приготвят с подходяща гъстота и се посяват в 96-ямкови плаки. Препоръчителната гъстота на посяване на клетките е $6,0 \times 10^3$ клетки на ямка, когато клетките се използват четири дни след посяване, или $3,0 \times 10^3$ клетки на ямка, когато клетките се използват пет дни след посяване, при обем на култура от 200 µl. Клетките, използвани за изпитването STE, които са посети в среда за отглеждане с подходящата гъстота, ще постигнат конфлуентност над 80% към момента на изпитване, *т.е.* четири или пет дни след посяване.

Прилагане на изпитваните химикали и веществата за контроли

18. Първият избор на разтворител за разтваряне или суспендиране на изпитвани химикали е физиологичен разтвор. Ако изпитваният химикал демонстрира слаба разтворимост или не може да се разтвори или суспендира равномерно в продължение на поне пет минути във физиологичен разтвор, се използва 5% DMSO (CAS № 67-68-5) във физиологичен разтвор като втори избор на разтворител. За изпитвани химикали, които не могат да се разтворят или суспендират равномерно в продължение на поне пет минути или във физиологичен разтвор, или в 5% DMSO във физиологичен разтвор, се използва минерално масло (CAS № 8042-47-5) като трети избор на разтворител.
19. Изпитваните химикали се разтварят или суспендират равномерно в избрания разтворител при 5% (w/w) концентрация и се разреждат допълнително чрез последователно 10-кратно разреждане до 0,5% и 0,05% концентрация. Всеки

изпитван химикал трябва да се изпитва и при двете концентрации от 5% и 0,05%. Клетките, култивирани в 96-ямкова плака, се експонират на 200 µl/клетка при концентрация или 5%, или 0,05% на разтвора на изпитвания химикал (или суспензия) в продължение на пет минути при стайна температура. Изпитваните химикали (вещества с една съставка или вещества с повече съставки, или смеси) се разглеждат като вещества в чист вид и се разреждат или суспендират съгласно метода, независимо от тяхната чистота.

20. Описаната в точка 16 среда за отглеждане се използва като контролна среда във всяка плака при всяко повторение. Освен това клетките трябва да се експонират и на проби на контрола на разтворител във всяка плака при всяко повторение. За изброените в точка 18 разтворители е потвърдено, че нямат нежелани ефекти върху жизнеспособността на SIRC клетките.
21. В изпитването STE трябва да се използва 0,01% натриев лаурил сулфат (SLS) във физиологичен разтвор като положителна контрола във всяка плака при всяко повторение. За да се изчисли клетъчната жизнеспособност на положителната контрола, всяка плака при всяко повторение трябва да включва и контрола на разтворител с физиологичен разтвор.
22. Празна ямка е необходима, за да се определи компенсацията за оптична плътност, и трябва да се извърши в ямките, съдържащи само фосфатно буфериран физиологичен разтвор, без калций или магнезий (PBS-) или клетки.
23. Всяка проба (изпитван химикал при 5% и 0,05%, контролна среда, контрола на разтворител и положителна контрола) следва да се изпитва три пъти при всяко повторение чрез експониране на клетките на 200 µl от съответния изпитван или контролен химикал в продължение на пет минути при стайна температура.
24. Контролните сравнителни вещества са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен химичен или продуктово клас, или за оценка на съответния потенциал за дразнещо действие на вещества с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен диапазон от реакции на дразнене.

Измерване на клетъчната жизнеспособност

25. След експозиция клетките се промиват два пъти с 200 µl PBS и се добавя 200 µl разтвор на МТТ (0,5 mg МТТ/ml от среда за отглеждане). След два часа време за реакция в инкубатор (37°C, 5% CO₂), разтворът на МТТ се декантира, МТТ формаза се екстрахира чрез добавяне на 200 µl 0,04 N солна киселина-изопропанол за 60 минути на тъмно при стайна температура и абсорбцията на разтвора МТТ формаза се измерва при 570 nm с четец на плаки. Взаимодействие на изпитвани химикали с анализа МТТ (чрез оцветители или

вещества, които непосредствено намаляват МТТ) възниква само ако значително количество от изпитван химикал остане в системата за изпитване при изплакване след експозиция, както е случаят за 3D реконструирана човешка роговица или реконструирани човешки епидермални тъкани, но това не се отнася за 2D клетъчни култури, използвани за метода на изпитване STE.

Интерпретация на резултатите и модел за прогнозиране

26. Стойностите на оптична плътност (OD), получени за всеки изпитван химикал, след това се използват за изчисляване на процента на клетъчна жизнеспособност спрямо контролата на разтворителя, който е определен на 100%. Относителната клетъчна жизнеспособност се изразява като процент и се получава чрез разделяне на OD на изпитван химикал на OD на контролата на разтворителя след изваждане на OD на празна ямка от двете стойности.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ of test chemical}) - (OD_{570} \text{ of blank})}{(OD_{570} \text{ of solvent control}) - (OD_{570} \text{ of blank})} \times 100$$

По подобен начин, относителната клетъчна жизнеспособност на всяка контрола на разтворител се изразява като процент и се получава чрез разделяне на OD на всяка контрола на разтворител на OD на контролната среда след изваждане на OD на празна ямка от двете стойности.

27. Следва да се извършат три независими повторения, всяко от които съдържа три репликирани ямки (*m.e.*, $n=9$). Аритметичната средна стойност на трите ямки за всеки изпитван химикал и контрола на разтворител при всяко независимо повторение се използва за изчисляване на аритметичната средна стойност на относителната клетъчна жизнеспособност. Окончателната аритметична средна стойност на клетъчната жизнеспособност се изчислява от трите независими повторения.
28. Граничните стойности на клетъчната жизнеспособност за идентифициране на изпитвани химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН/CLP), и изпитвани химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите (без категория по GHS на ООН/CLP) са дадени по-долу.

Таблица 2: Модел на прогнозиране за метода за изпитване STE

Клетъчна жизнеспособност		Класификация по GHS на ООН/CLP	Приложимост
При 5%	При 0,05%		
> 70%	> 70%	Без категория	Вещества и смеси, с изключение на: i) силно летливи вещества с налягане на пари

			над 6 kPa ¹ и ii) твърди химикали (вещества и смеси), различни от повърхностноактивни вещества, и смеси, съставени само от повърхностноактивни вещества
≤ 70%	> 70%	Не може да се направи прогноза	Не е приложимо
≤ 70%	≤ 70%	Категория 1	Вещества и смеси ²

Смеси, съдържащи вещества с налягане на пари по-високо от 6kPa, следва да се оценяват внимателно, за да се избегнат потенциални класифицирания на по-ниско ниво, и следва да се обосновават за всеки конкретен случай. Въз основа на резултати, получени предимно от вещества с една съставка, въпреки че има ограничени данни и за изпитването на смеси. Независимо от това методът за изпитване е технически приложим за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси. Настоящият метод за изпитване не е приложим за изпитване на метални съединения, тъй като за тях е известно, че реагират с белтъци по механизми, различни от ковалентното свързване. Изпитваният химикал следва да бъде разтворим в подходящ разтворител при крайна концентрация от 100 mM (виж точка18). Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

Критерии за приемливост

29. Резултатите от изпитването се считат за приемливи, когато са изпълнени всички от следните критерии:

- а) Оптичната плътност на контролната среда (експонирана на средата на културата) следва да е 0,3 или по-висока след изваждане на оптичната плътност на празна ямка.
- б) Жизнеспособността на контролата на разтворителя следва да е 80% или по-висока спрямо контролната среда. Ако при всяко повторение се използват множество контроли на разтворител, всяка от тези контроли следва да демонстрира клетъчна жизнеспособност по-голяма от 80% за класифициране на изпитваните химикали, изпитвани с тези разтворители.
- в) Клетъчната жизнеспособност, получена с положителната контрола (0,01% SLS) следва да е в рамките на две стандартни отклонения на средната стойност от предходни периоди. Горната и долната граници на приемливост за положителната контрола следва да се актуализират често, т.е. на всеки три месеца или всеки път, когато в лаборатории, в които рядко се провеждат изпитвания, е проведено приемливо изпитване (т.е. по-рядко от веднъж месечно). Когато дадена лаборатория не проведе достатъчен брой опити за установяване на статистически надеждно разпределение на положителна контрола, приемливо е да се използват горната и долната граници на приемливост, установени от разработчика на метода, т.е. между 21,1% и 62,3% според неговите лабораторни данни за предходни периоди, докато вътрешното разпределение се изгражда по време на първите рутинни изпитвания.

- г) Стандартното отклонение на окончателната клетъчна жизнеспособност, произтичащо от три независими повторения, следва да е по-малко от 15% и за двете концентрации от 5% и 0,05% на изпитвания химикал.

Ако един или няколко от тези критерии не са изпълнени, резултатите следва да се отхвърлят и да се проведат други три независими повторения.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

30. Данните за всяка отделна ямка (напр. стойности на клетъчна жизнеспособност) за всяко повторение, както и общата средна стойност, стандартното отклонение и класифицирането следва да се докладват.

Протокол от изпитването

31. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал и контролни вещества

- - Вещество с една съставка: химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или CAS, регистрационен(ни) номер(а) по CAS, SMILES или InChI код, структурна формула и/или други идентификатори;
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес: характеризирание, доколкото е възможно, чрез химическа идентичност (вж. по-горе), чистота, количествен състав и относимите физични и химични свойства (вж. по-горе) на съставките, доколкото са налични;
- - Агрегатно състояние, летливост, pH, LogP, молекулно тегло, химически клас и допълнителни относими физически и химични свойства, съответстващи на провеждането на проучването, доколкото са налични;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Третиране преди изпитване, ако е приложимо (напр. затопляне, смилане);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.

Условия и процедури на метода за изпитване

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Описание на използвания метод за изпитване;
- Използвана клетъчна линия, брой на преминавания и конfluентност на клетките, използвани за изпитване;

- Подробни данни за използваната процедура за изпитване;
- Брой на извършените повтаряния и използвани повторения;
- Използвани концентрации на изпитвания химикал (ако са различни от препоръчителните);
- Обосновка за избора на разтворител за всеки изпитван химикал;
- Продължителност на експозиция на изпитвания химикал (ако е различна от препоръчителната);
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Препратка към средна стойност на положителна контрола и стандартно отклонение (SD) за предходни периоди:
- Доказване на компетентност на лабораторията за провеждане на метода за изпитване (напр. чрез изпитване на опитни вещества) или доказване на възпроизводима ефикасност на метода за изпитване във времето.

Резултати

- Представяне в табличен вид, за всеки изпитван химикал и контролно вещество, и за всяка изпитвана концентрация, на отделните OD стойности за репликирана ямка, аритметичните средни OD стойности за всяко независимо повторение, % на клетъчна жизнеспособност за всяко независимо повторение и окончателният аритметичен среден % на клетъчна жизнеспособност и SD за трите повторения;
- Резултатите за средата, разтворителя и положителната контрола доказват подходящи критерии за приемливост на проучването;
- Описание на други наблюдавани ефекти;
- Общата получена класификация по отношение на използвания модел за прогнозиране/критерии за вземане на решение.

Обсъждане на резултатите

Заклучения

ЛИТЕРАТУРА

- (8) Глава Б.5 от настоящото Приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху очите.

Допълнение

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване (13).

Еталонно вещество: Вещество, използвано като еталон за сравнение с изпитван химикал. Едно сравнително контролно вещество следва да притежава следните свойства; (i) постоянен и надежден източник (или източници); (ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните химикали; (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия и (v) известен потенциал в рамките на размаха на желания отклик.

Подход „отдолу нагоре“: поетапен подход, използван за химикали, за които се предполага, че не изискват класифициране за дразнене сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, за които не се изисква класифициране (отрицателни резултати) по отношение на други химикали (положителни резултати)

Химикал: Вещество или смес.

Дразнене на очите: Предизвикване на промени в очите вследствие на прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, които са напълно обратими в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Обратими ефекти върху очите“ и с „Категория 2 по GHS на ООН/CLP“

Честота на фалшивонегативните резултати: Делът на всички положителни химикали, невярно определени като отрицателни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Честота на фалшивопозитивните резултати: Делът на всички отрицателни химикали, невярно определени като положителни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

Контролна среда: Нетретирано повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне дали разтворителят взаимодейства с изпитваната система.

Смес: Смес или разтвор, съставен от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

МТТ: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид; Тиазолил син тетразолиев бромид.

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

ОД: Оптична плътност.

Положителни контроли: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (10).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повтораемост (13).

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (10).

Сериозно увреждане на очите: Предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Необратими ефекти върху очите“ и с „Категория 1 по GHS на ООН/CLP“.

Контрола на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система, включително разтворителя или носителя, която се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне на базовия отклик при пробите, третирани

с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна контролна среда, тази проба показва също дали разтворителят или носителът взаимодействат с изпитваната система.

Специфичност: Относителният дял от всички негативни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на метода за изпитване (13).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността му, както и всички примеси, извлечени от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговия състав.

Повърхностноактивно вещество: също така наречено повърхностноактивен агент, представлява вещество, като например детергент, което е в състояние да намали повърхностното напрежение на дадена течност и по този начин да позволи образуването на пяна в течността или проникването и в твърди вещества; Известно е също като мокрител.

Изпитван химикал: всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Стратегия за поетапно изпитване: стратегия за поетапно изпитване, при която цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал не може да се определи въз основа на съществуващата информация, се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи ясно класифициране.

Подход „отгоре надолу“: поетапен подход, използван за химикал, за който се предполага, че предизвиква сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (положителен резултат) по отношение на други химикали (отрицателен резултат).

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетиране на химикали (GHS на ООН): Система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми,

сигнални думи, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

Категория 1 по GHS на ООН/CLP: Вж. „Сериозно увреждане на очите“.

Категория 2 по GHS на ООН/CLP: Вж. „Дразнене на очите“.

„Без категория“ по GHS на ООН/CLP: Химикали, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 (2A или 2B) по GHS на ООН/CLP.

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Б.69 МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ, ПРИЛИЧАЩ НА РОГОВИЦА ЕПИТЕЛ (RhCE) ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХИМИКАЛИ, НЕ ИЗИСКВАЩИ КЛАСИФИЦИРАНЕ И ЕТИКЕТИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 492 (2017). *Сериозно увреждане на очите* означава предизвикване на тъканно увреждане на очите или сериозно физическо увреждане на зрението след прилагане на изпитван химикал върху предната повърхност на очите, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането, както е определено от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетиране на химикали (GHS) на Организацията на обединените нации (ООН) (1) и Регламент на Европейския съюз (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP)¹. Също според GHS на ООН и CLP *дразнене на очите* означава предизвикване на промени в очите след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на очите, които са напълно обратими в рамките на 21 дни след прилагането. Изпитваните химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, се класифицират като категория 1 по GHS на ООН и CLP, докато тези, които предизвикват дразнене на очите, се класифицират като категория 2 по GHS на ООН и CLP. Изпитвани химикали, некласифицирани за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, са онези, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 (2A или 2B) по GHS на ООН и CLP, т.е. те се определят като „без категория“ по GHS на ООН и CLP.
2. Оценката на сериозно увреждане на очите/дразнене на очите обикновено включва използването на лабораторни животни (МИ В.5 (2)). Изборът на най-подходящия метод за изпитване и използването на този метод за изпитване следва да се разглежда в контекста на насоките на ОИСП за интегрирани подходи за изпитване и оценка на сериозно увреждане на очите и дразнене на очите (39).

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006, ОВ L 353/1, 31.12.2008 г.

3. Настоящият метод за изпитване описва *in vitro* процедура, която позволява идентифицирането на химикали (вещества и смеси), които не изискват класифициране и етикетиране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите в съответствие с GHS на ООН и CLP. Той използва реконструиран човешки, приличащ на роговица епител (RhCE), който силно наподобява хистологичните, морфологичните, биохимичните и физиологичните свойства на човешкия роговичен епител. Четири други метода за изпитване *in vitro* са валидирани, считат се за научно потвърдени и са приети като МИ Б.47 (3), Б.48 (4), Б.61 (5) и Б.68 (6), за работа с крайните точки за човешкото здраве сериозно увреждане на очите/дразнене на очите.
4. В този метод за изпитване са включени две валидирани, налични в търговската мрежа RhCE изпитвания. Изследвания за валидиране за оценка на дразнене на очите/сериозно увреждане на очите са проведени (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) с използване на изпитването за дразнене на очите (EIT) EpiOcular™ и теста за дразнене на очите (EIT) SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE). Всяко едно от тези изпитвания използва като система за изпитване предлагани в търговската мрежа тъканни модели на RhCE, които в текста по-нататък се наричат валидирани референтни методи — съответно VRM 1 и VRM2. В резултат на тези изследвания за валидиране и тяхната независима партньорска проверка (9)(12) се стигна до заключение, че EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT са в състояние правилно да идентифицират химикали (вещества и смеси), не изискващи класифициране и етикетиране за дразнене за очите или сериозно увреждане на очите съгласно GHS на ООН, и тестовете се препоръчват като научно потвърдени за тази цел (13).
5. Понастоящем е общоприето, че в обозримо бъдеще, нито един метод за изпитване *in vitro* няма да е в състояние да замени напълно изпитването *in vivo* на Draize (2)(14) при прогнозирането в целия спектър на сериозно увреждане на очите/дразнене на очите, за различните класове химикали. При все това стратегическите комбинации от няколко алтернативни методи за изпитване в рамките на стратегия за (постепенно) изпитване, като подходът „отгоре надолу“, може да са в състояние да заменят изпитването на очите на Draize (15). Подходът „отдолу нагоре“ (15) е създаден да се използва, когато въз основа на наличната информация се очаква химикалът да не причини достатъчно дразнене на очите, за да изисква класифициране, докато подходът „отгоре надолу“ (15) е създаден да се използва, когато въз основа на наличната информация се очаква даден химикал да причини сериозно увреждане на очите. EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT се препоръчват за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите според GHS на ООН/CLP (без категория) без допълнително изпитване, в

рамките на стратегия за изпитване като подхода „отдолу нагоре/отдолу нагоре“, предложен от Scott *et al.*, напр. като първоначална стъпка при подход „отдолу нагоре“ или като една от последните стъпки при подход „отгоре надолу“ (15). Въпреки това EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT не са предназначени за разграничаване между категория 1 по GHS на ООН/CLP (сериозно увреждане на очите) и категория 2 по GHS на ООН/CLP (дразнене на очите). За такова разграничаване трябва да се работи в друг етап на стратегията за изпитване (15). Изпитван химикал, който се идентифицира като изискващ класификация за дразнене на очите/сериозно увреждане на очите с EpiOcular™ EIT или SkinEthic™ HCE EIT, следователно изисква допълнително изпитване (*in vitro* и/или *in vivo*), за да се стигне до окончателно заключение (без категория по GHS на ООН/CLP, категория 2 или категория 1), с използване напр. на МИ Б.47, Б.48, Б.61 или Б.68.

6. Целта на настоящия метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалната опасност за очите на даден изпитван химикал въз основа на неговата способност да предизвиква цитотоксичност при тъканен модел с RhCE, измерена чрез анализа МТТ (16) (вж. точка 21). Жизнеспособността на тъканта RhCE след експозиция на изпитван химикал се определя в сравнение с тъкани, третирани с вещество за отрицателна контрола (% на жизнеспособност), и след това се използва за прогнозиране на потенциалната опасност за очите на изпитвания химикал.
7. Налични са стандарти за ефективност (17) за улесняване на валидирането на нови или модифицирани тестове *in vitro* на база RhCE, подобни на EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT, в съответствие с принципите на Ръководство № 34 на ОИСП (18), които позволяват своевременна промяна на ОИСП TG 492 за тяхното включване. Взаимното приемане на данни (MAD) съгласно споразумението на ОИСП се гарантира само за изпитвания, които са валидирани според стандартите за ефективност, ако тези изпитвания са прегледани и включени в съответните насоки за изпитвания от ОИСП.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

8. Определенията са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

9. Настоящият метод за изпитване се основава на търговски триизмерни тъканни модели на RhCE, които се произвеждат с използване или на първични човешки епидермални кератоцити (т.е. EpiOcular™ OCL-200), или на човешки безсмъртни роговични епителни клетки (т.е. SkinEthic™ HCE/S). Тъканните

модели EpiOcular™ OCL-200 и SkinEthic™ HCE/S RhCE са подобни на *in vivo* триизмерната структура на роговичния епител и се произвеждат с използване на клетки от видове, представляващи интерес (19)(20). Освен това изпитванията измерват директно цитотоксичността, предизвикана от проникването на химикала през роговицата и увреждането на клетки и тъкани; след това цитотоксичният отклик определя общия резултат за *in vivo* сериозно увреждане на очите/дразнене на очите. Клетъчно увреждане може да възникне при различни механизми на действие (вж. точка 20), но цитотоксичността играе важна, ако не и основна, механистична роля за определяне на общия отклик на химикал за сериозно увреждане на очите/дразнене на очите, което се проявява *in vivo* предимно чрез непрозрачност на роговицата, ирит, зачервяване на конюнктивата и/или конюнктивален хемозис, независимо от физичните и химичните процеси на основно тъканно увреждане.

10. В изследването за валидиране, лежащо в основата на този метод за изпитване, е изпитан широк спектър от химикали, обхващащи разнообразни химични видове, химични класове, молекулни тегла, LogP, химични структури и др. Базата данни за валидиране на EpiOcular™ EIT съдържа общо 113 химикали, обхващащи 95 различни органични функционални групи съгласно анализ на кутията с инструменти QSAR на ОИСП (8). Повечето от тези химикали представляват вещества с една съставка, но в проучването са включени и няколко вещества с повече съставки (включително 3 хомополимери, 5 съполимери и 10 квазиполимери). По отношение на агрегатното състояние и категориите по GHS на ООН/CLP 113-те изпитвани химикали се разпределят както следва: 13 течности от категория 1, 15 твърди вещества от категория 1, 6 течности от категория 2A, 10 твърди вещества от категория 2A, 7 течности от категория 2B, 7 твърди вещества от категория 2B, 27 течности без категория и 28 твърди вещества без категория (8). Базата данни за валидиране на SkinEthic™ HCE EIT съдържа общо 200 химикали, обхващащи 165 различни органични функционални групи (8)(10)(11). Повечето от тези химикали представляват вещества с една съставка, но в проучването са включени и няколко вещества с повече съставки (включително 10 полимера). По отношение на агрегатното състояние и категориите по GHS на ООН/CLP 200-те изпитвани химикали се разпределят както следва: 27 течности от категория 1, 24 твърди вещества от категория 1, 19 течности от категория 2A, 10 твърди вещества от категория 2A, 9 течности от категория 2B, 8 твърди вещества от категория 2B, 50 течности без категория и 53 твърди вещества без категория (10)(11).
11. Този метод за изпитване е приложим за вещества и смеси, както и за твърди вещества, течности, полутвърди вещества и восъци. Течностите могат да бъдат или да не бъдат водни разтвори; твърдите вещества може да са разтворими или

неразтворими във вода. Когато е възможно, твърдите вещества следва да бъдат смилани до фин прах преди прилагане; не се изисква друга предварителна обработка на пробата. Газове и аерозоли не са оценявани с изследване за валидиране. Макар да се предполага, че те могат да бъдат изпитвани с използване на технология с RhCE, настоящия метод за изпитване не разрешава изпитване на газове и аерозоли.

12. Изпитваните химикали, поглъщащи светлина в същия диапазон като МТТ формаза (по естествен път и след третиране) и изпитваните химикали, които могат пряко да редуцират виталния оцветител МТТ (до МТТ формаза), могат да попречат на измерванията на жизнеспособността на тъканта и изискват употребата на адаптирани контроли за корекции. Типът на адаптираните контроли, които може да са необходими, варира в зависимост от типа на интерференцията, предизвикана от изпитвания химикал и използваната процедура за количествено измерване на МТТ формаза (вж. точки 36-42).
13. Генерираните резултати в проучвания за предварително валидиране (21)(22) и пълно валидиране (8)(10)(11) показват, че и EpiOcular™ EIT, и SkinEthic™ HCE EIT могат да бъдат прехвърлени в лаборатории, за които се счита, че нямат опит в извършването на анализи, и са възпроизводими в рамките на лабораторията и между лабораториите. Въз основа на тези проучвания нивото на възпроизводимост по отношение на съгласуване на прогнозите, което може да се очаква при EpiOcular™ EIT от данни за 113 химикали, е от порядъка на 95% в рамките на лабораторията и 93% между лаборатории. Нивото на възпроизводимост по отношение на съгласуване на прогнозите, което може да се очаква при SkinEthic™ HCE EIT от данни за 120 химикали, е от порядъка на 92% в рамките на лабораторията и 95% между лаборатории.
14. EpiOcular™ EIT може да се използва за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите съгласно системата за класифициране GHS на ООН и CLP. Предвид данните, получени във изследването за валидиране (8), EpiOcular™ EIT има обща точност от 80% (въз основа на 112 химикали), чувствителност 96% (въз основа на 57 химикали), процент неверни отрицателни резултати 4% (въз основа на 57 химикали), специфичност 63% (въз основа на 55 химикали) и процент неверни положителни резултати 37% (въз основа на 55 химикали) в сравнение с референтни данни от изпитване *in vivo* върху очи на зайци (МИ Б.5) (2)(14), класифицирани съгласно системата за класифициране GHS на ООН и CLP. Едно проучване, в което 97 течни агрохимични формули се изпитват с EpiOcular™ EIT, показва подобна ефективност на метода за изпитване за този вид смеси като получената във валидиращото проучване (23). 97-те формули се разпределят както следва: 21 от категория 1, 19 от категория 2А, 14 от категория

2B и 43 без категория, класифицирани съгласно системата за класифициране GHS на ООН въз основа на референтни данни от изпитване *in vivo* върху очи на зайци (МИ Б.5) (2)(14). Получена е обща точност от 82% (въз основа на 97 формули), чувствителност 91% (въз основа на 54 формули), процент неверни отрицателни резултати 9% (въз основа на 54 формули), специфичност 72% (въз основа на 43 формули) и процент неверни положителни резултати 28% (въз основа на 43 формули) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT може да се използва за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите съгласно системата за класифициране GHS на ООН и CLP. Предвид данните, получени във изследването за валидиране (10)(11), SkinEthic™ HCE EIT има обща точност от 84% (въз основа на 200 химикали), чувствителност 95% (въз основа на 97 химикали), процент неверни отрицателни резултати 5% (въз основа на 97 химикали), специфичност 72% (въз основа на 103 химикали) и процент неверни положителни резултати 28% (въз основа на 103 химикали) в сравнение с референтни данни от изпитване *in vivo* върху очи на зайци (МИ Б.5) (2)(14), класифицирани съгласно системата за класифициране GHS на ООН и CLP.
16. Процентът на неверни отрицателни резултати, получен и при двете изпитвания с RhCE с вещества или смеси, попада в рамките на 12% обща вероятност, че химикалите се идентифицират или като категория 2 по GHS на ООН и CLP, или като „без категория по GHS на ООН и CLP“ чрез изпитването *in vivo* на Draize, при повтарящи се изпитвания; това се дължи на присъщата за метода променливост в рамките на изпитването (24). Процентът на неверни положителни резултати, получени при двата метода на изпитване с RhCE с вещества или смеси, не е от решаващо значение в контекста на този метод за изпитване, тъй като всички изпитвани химикали, които предизвикват тъканна жизнеспособност равна или по-малка от установените гранични стойности (вж. точка 44) изискват по-подробно изпитване с други *in vitro* методи за изпитване, или като последен вариант — изпитване върху зайци, в зависимост от регулаторните изисквания, с използване на последователна стратегия за изпитване и подход за тежест на доказателства. Тези методи за изпитване могат да се използват за всички видове химикали, при които отрицателен резултат следва да се приеме като неклассифициране на химикал за дразнене на очите и сериозно увреждане на очите (без категория по GHS на ООН и CLP). Необходима е консултация със съответните регулаторни органи, преди да се използват EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT в схеми на класифициране, различни от тези на GHS на ООН/CLP.

17. Ограничението на настоящия метод за изпитване е, че той не позволява разграничаване между дразнене на очите/обратими ефекти върху очите (категория 2) и сериозно увреждане на очите/необратими ефекти върху очите (категория 1), както са определени от GHS на ООН и CLP, нито между дразнещи очите (допълнителна категория 2A) и леко дразнещи очите (допълнителна категория 2B), както са определени от GHS на ООН (1). За тези цели се изисква допълнително изпитване с друг *in vitro* метод за изпитване.
18. Терминът „изпитван химикал“ се използва в този метод за изпитване за обозначаване на това, какво се изпитва,¹ и не е свързан с приложимостта на метода за изпитване с RhCE за изпитване на вещества и/или смеси.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

19. Изпитваният химикал се прилага локално на минимум два триизмерни тъканни модели на RhCE и тъканната жизнеспособност се измерва след експозиция и инкубационния период след третиране. RhCE тъканите се реконструират от първични човешки епидермални кератоцити или човешки безсмъртни роговични епителни клетки, които са култивирани в продължение на няколко дни, за да образуват стратифициран, силно диференциран плоскоклетъчен епител, който е морфологично подобен на този, който се открива в човешката роговица. Тъканния модел на RhCE на EpiOcular™ RhCE се състои от поне 3 жизнеспособни слоя клетки и некератинизирана повърхност, която наподобява структурата на роговица, аналогична на откриваната *in vivo*. Тъканният модел на RhCE на SkinEthic™ HCE RhCE се състои от поне 4 жизнеспособни слоя клетки, включващи колонни базални клетки, преходни криловидни клетки и повърхностни сквамозни клетки, подобни на тези в нормалния човешки роговичен епител (20)(26).
20. Предизвиканото по химичен начин сериозно увреждане на очите/дразнене на очите, което се проявява *in vivo* предимно чрез непрозрачност на роговицата, ирит, зачервяване на конюктивата и/или конюктивален хемозис, е резултат от поредица събития, започващи с проникване на химикала през роговицата и/или конюктивата и увреждане на клетките. Клетъчно увреждане може да възникне чрез няколко механизма на действие, включващи: лизис на клетъчната мембрана

¹ През юни 2013 г. на съвместно заседание на ОИСР се постигна съгласие, че сега за новите и актуализираните насоки за изпитване на ОИСР следва да се прилага по-последователна употреба на термина „изпитван химикал“, описващ какво се изпитва, където е възможно.

(напр. от повърхностноактивни вещества, органични разтворители); коагулация на макромолекули (по-специално протеини) (напр. от повърхностноактивни вещества, органични разтворители, основи и киселини); осапуняване на липиди (напр. от основи); и алкилиране или други ковалентни взаимодействия с макромолекули (напр. от избелващи вещества, пероксиди и алкилатори) (15)(27)(28). Въпреки това е доказано, че цитотоксичността играе важна, ако не и основна, механистична роля за определяне на общия отклик на химикал за сериозно увреждане на очите/дразнене на очите, независимо от физичните и химичните процеси на основно тъканно увреждане (29)(30). Освен това потенциалът на даден химикал за сериозно увреждане на очите/дразнене на очите принципно се определя от степента на първоначално увреждане (31), която корелира със степента на клетъчна смърт (29) и със степента на последващи отговори и евентуални резултати (32). Следователно слабите дразнителни обикновено засягат само повърхностния роговичен епител, леките и умерените дразнителни увреждат принципно епитела и повърхностната строма и силните дразнителни увреждат епитела, дълбоката строма и понякога ендотелия на роговицата (30)(33). Измерването на жизнеспособността на тъканния модел на RhCE след локална експозиция на даден изпитван химикал за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за сериозно увреждане на очите/дразнене на очите (без категория по GHS на ООН и CLP), се основава на допускането, че всички химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите или дразнене на очите, предизвикват цитотоксичност в роговичния епител и/или конюнктивата.

21. Тъканната жизнеспособност на RhCE класически се измерва чрез ензимно превръщане на виталния оцветител МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид; Тиазолил син тетразолиев бромид; CAS номер 298-93-1] от жизнеспособните клетки на тъканта в синя МТТ формаза нова сол, която се измерва количествено след екстракция от тъканите (16). Химикалите, които не изискват класифициране и етикетиране съгласно GHS на ООН/CLP (без категория), се идентифицират като такива, които не намаляват тъканната жизнеспособност под определен праг (т.е. тъканна жизнеспособност > 60% при EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EITL¹ или > 50% при SkinEthic™ HCE EITS²) (вж. точка 44).

¹ EITL: EIT за течности в случай на SkinEthic™ HCE

² EITS: EIT за твърди вещества в случай на SkinEthic™ HCE

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

22. Преди рутинно използване на RhCE изпитвания за регулаторни цели, лабораториите следва да демонстрират техническа компетентност чрез правилно прогнозиране на петнадесет химикали за изпитване за пригодност, изброени в Таблица 1. Тези химикали са избрани от химикалите, използвани във валидиращите проучвания на VRM (8)(10)(11). Изборът включва, до възможната степен, химикали, които: (i) обхващат различни агрегатни състояния; (ii) обхващат пълния спектър на *in vivo* отговори на сериозно увреждане на очите/дразнене на очите въз основа на висококачествени резултати, получени при референтно изпитване *in vivo* върху очи на зайци (МИ Б.5) (2)(14) и системата за класифициране GHS на ООН (т.е. категории 1, 2А, 2В или без категория) (1) и системата за класифициране CLP (т.е. категории 1, 2 или без категория); (iii) обхващат различни *in vivo* фактори за класифициране (24)(25); (iv) са представителни са за химичните класове, използвани във изследването за валидиране (8)(10)(11); (v) обхващат добро и обширно представяне на органични функционални групи (8)(10)(11); (iv) имат химически структури, които са добре определени (8)(10)(11); (vii) са оцветени и/или са преки редуктори на МТТ; (viii) предизвикват възпроизводими резултати в методите за изпитване на RhCE по време на тяхното валидиране; (ix) са правилно предсказани от методите за изпитване на RhCE по време на техните изследвания за валидиране; (x) обхващат пълния спектър на *in vitro* отговори въз основа на висококачествени данни от методи за изпитване на RhCE (0 до 100% жизнеспособност); (xi) се предлагат в търговската мрежа; и (xii) не са свързани с прекалено високи разходи за придобиване и/или обезвреждане. В ситуации, когато изброен химикал не е наличен или не може да се използва поради други обосновани причини, може да се използва друг химикал, който отговаря на гореописаните критерии, напр. от химикалите, използвани за валидиране на VRM. Тези отклонения обаче следва да са оправдани.

Таблица 1: Списък на химикалите за изпитване за пригодност

[illegible]

Химично наименование	CAS №	Органична функционална група ¹	Агрегатно състояние	VRM1 жизнеспособност (%) ²	VRM2 жизнеспособност (%) ³	VRM прогноза	Редуктор на МТТ	Цветно взаимодействие
Диетил толуамид	134-62-3	Бензамид	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Не може да се направи прогноза	N	N
2,2-диметил-3-метиленибицикло [2.2.1] хептан	79-92-5	Алкан, разклонен с третичен въглерод; Алкен; Бициклохептан; Карбоцикли с пръстен; Циклоалкан	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Не може да се направи прогноза	N	N
In Vivo без категория⁴								
1-етил-3-метилмидазолинов етилсулфат	342573-75-5	Алкокси; Амониева сол; Арил; Имидазол; Сулфати	L	79,9±6,4	79,4±6,2	Без категория	N	N
Дикаприлил етер	629-82-3	Алкокси; Етер	L	97,8±4,3	95,2±3,0	Без категория	N	N
Пиперонил бутоксид	51-03-6	Алкокси; Бензодиоксол; Бензил; Етер	L	104,2±4,2	96,5±3,5	Без категория	N	N
Полиетилен гликол (PEG-40) хидрогенирано рициново масло	61788-85-0	Ацилал; Алкохол; Алил; Етер	Вискозна	77,6±5,4	89,1±2,9	Без категория	N	N
1-(4-хлорфенил)-3-(3,4-дихлорфенил) урея	101-20-2	Ароматен хетероциклически халид; Арил халид; Деривати на урея	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Без категория	N	N
2,2'-метилени-бис-(6-(2Н-бензотриазол-2-ил)-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенол)	103597-45-1	Алкан, разклонен с четвъртичен въглерод; Слят, карбоциклически, ароматен; Слети наситени хетероцикли; Прекурсори на хиноидни съединения; терт-бутил	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Без категория	N	N
Калиев тетрафлуороборат	14075-53-7	Неорганична сол	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Без категория	N	N

Съкращения: CAS № = Номер по Служба за химични индекси CAS; UN GHS = Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за

класифициране и етикетиране на химикали (GHS на ООН) (1); VRM1 = Валидиран референтен метод, EpiOcular™ EIT; VRM2 = Валидиран референтен метод, SkinEthic™ HCE EIT; Цветно взаимодействие = цветно взаимодействие при измерване на стандартна абсорбция (оптична плътност (OD)) на МТТ формазан.

¹Присвоена органична функционална група съгласно „вложен“ анализ чрез кутия с инструменти 3.1 на ОИСП (8).

²Въз основа на резултати, получени с EpiOcular™ EIT във валидиращото проучване на EURL ECVAM/Cosmetics Europe за дразнене на очите (EIVS) (8).

³ Въз основа на резултати, получени със SkinEthic™ HCE EIT във валидиращото проучване (10)(11).

⁴Въз основа на резултати от изпитването *in vivo* върху очи на зайци (МИ Б.5/ОИСП TG 405) (2)(14) и с използване на GHS на ООН.

⁵Въз основа на резултати, получени в проучването със стратегия за изпитване на CEFIC CONsortium за *in vitro* дразнене на очите (CON4EI).

⁶Класифицирането като 2А или 2В зависи от тълкуването на критерия по GHS на ООН за разграничаване на тези две категории, т.е. 1 от 3 спрямо 2 от 3 животни с ефекти в ден 7 са необходими за класифициране като категория 2А. Проучването *in vivo* включва 3 животни. Всички крайни точки освен непрозрачност на роговицата при едно животно се възстановяват до оценка нула до ден 7 или по-рано. Едно от животните, което не се възстанови напълно до ден 7, имаше оценка 1 за непрозрачност на роговицата (в ден 7) и се възстанови напълно в ден 9.

23. Като част от процедурата за изпитване на пригодността е препоръчително потребителите да проверят бариерните свойства на тъканите след получаване, както е посочено от производителя на тъканния модел RhCE (вж. точки 25, 27 и 30). Това е особено важно, ако тъканите са били превозвани на дълго разстояние или в продължение на дълги периоди от време. След като даден метод за изпитване е бил успешно създаден и пригодността за употребата му - установена и доказана, обикновено такава проверка няма да е необходима. Все пак, при редовно използване на даден метод за изпитване, е препоръчително да се продължи с оценяването на бариерните свойства на редовни интервали.

ПРОЦЕДУРА

24. Обхванатите от този метод за изпитване тестове са валидните от научна гледка тестове EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), които по-нататък са наричани валидирани референтни методи (съответно VRM1 и VRM2). Стандартни оперативни процедури (СОП) за методите за изпитване на RhCE са налични и следва да се използват при внедряване и използване на тези методи за изпитване в лаборатория (34)(35). Следващите точки и Допълнение 2 описват основните компоненти и процедури на RhCE тестовете.

КОМПОНЕНТИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НА RHCE

Общи условия

25. Следва да се използват подходящи клетки от човешки произход за реконструиране на наподобяваща роговица епителна триизмерна тъкан, която следва да е съставена от постепенно стратифицирани, но не вроговени клетки. Тъканният модел с RhCE се приготвя във вложки с порьозна синтетична мембрана, през която хранителни вещества могат да преминават в клетките. В реконструирувания наподобяващ роговица епител трябва да присъстват множество слоеве от жизнени, некератинизирани епителни клетки. Тъканният модел на RhCE следва да има епителна повърхност, която влиза в директен контакт с въздух, така че да позволява непосредствена локална експозиция на изпитваните химикали по начин, който наподобява *in vivo* експозицията на роговичния епител. Тъканният модел на RhCE следва да образува функционална бариера, която е достатъчно здрава да устои на бързото проникване на цитотоксични вещества за сравнение, напр. Triton X-100 или натриев додецил сулфат (SDS). Бариерната функция следва да бъде доказана и може да бъде оценена чрез определяне или на времето на експозиция, необходимо за намаляване на тъканната жизнеспособност с 50% (ET₅₀) след приложение на вещество за сравнение със специфична, фиксирана концентрация (напр. 100 µl

от 0,3% (v/v) Triton X-100), или на концентрацията, при която дадено вещество за сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50% (IC_{50}) след фиксирано време на експозиция (напр. 30 минути третиране с 50 μ l SDS) (вж. точка 30). Задържащите свойства на модела на RhCE следва да предотвратяват преминаването на изпитван химикал около края на жизнеспособната тъкан, което би довело до незадоволително моделиране на експозицията на роговицата. Клетките от човешки произход, използвани за създаване на тъканния модел на RhCE, следва да не са замърсени с бактерии, вируси, микоплазма и гъбички. Стерилността на тъканния модел следва да се провери от доставчика за липса на замърсяване с гъбички и бактерии.

Функционални условия

Жизнеспособност

26. Използваният анализ за количествено определяне на жизнеспособността на тъканта е анализът МТТ (16). Жизнеспособните клетки на тъканния модел на RhCE редуцират виталния оцветител МТТ в син формазаанов преципитат на МТТ, който след това се извлича от тъканта с помощта на изопропанол (или подобен разтворител). Извлеченият МТТ формазаан може да се определи количествено с помощта или на измерване на стандартната абсорбция (оптична плътност, (OD)), или чрез BETX/UBETX спектрофотометрична процедура (36). OD само на разтворителя, използван за екстракцията, следва да бъде достатъчно ниска, т.е., $OD < 0,1$. Ползвателите на тъканния модел на RhCE следва да гарантират, че всяка използвана партида с тъканен модел на RhCE отговаря на определените критерии за отрицателната контрола. Границите на приемливост за OD стойностите на отрицателната контрола за VRM са дадени в Таблица 2. Ползвателят на BETX/UBETX спектрофотометрия следва да използва интервалите за OD за отрицателната контрола, посочени в таблица 2, като критерий за приемливост за отрицателната контрола. В протокола за изпитването следва да се документира, че тъканите, третирани с веществото на отрицателната контрола, са стабилни в култура (показват сходни измервания за тъканна жизнеспособност) за периода на продължителност на експозицията. Подобна процедура следва да се спазва от производителя на тъканта като част от качествения контрол за освобождаване на партидата тъкани, но в този случай може да се прилагат критерии за приемливост, различни от посочените в Таблица 2. Разработчикът/доставчикът на тъканния модел на RhCE следва да определи интервал на приемливост (горна и долна граница) за стойностите на OD на отрицателната контрола (при условията за качествен контрол на метода за изпитване).

Таблица 2: Интервали на приемливост за стойности на OD за отрицателна контрола (за потребители на теста)

Тест	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiOcular™ EIT (OCL-200) — VRM1 (за протоколите за течности и твърди вещества)	> 0,8 ¹	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) — VRM2 (за протоколите за течности и твърди вещества)	> 1,0	≤ 2,5

¹Тази граница на приемливост отчита възможността за удължен период на транспортиране/съхранение (напр. > 4 дни), която е показала, че не влияе върху ефективността на метода за изпитване (37).

Барьерна функция

27. Тъканият модел на RhCE следва да е с достатъчна дебелина и здравина, за да устои на бързото проникване на цитотоксични вещества за сравнение, както е оценено напр. от ET₅₀ (Triton X-100) или от IC₅₀ (SDS) (Таблица 3). Барьерната функция на всяка партида от използвания тъканен модел на RhCE следва да бъде доказана от разработчика/доставчика на тъканния модел на RhCE при доставяне на тъканите на крайния потребител (вж. точка 30).

Морфология

28. Хистологичното изследване на тъканния модел на RhCE следва да докаже наподобяваща човешка роговица епителна структура (включително поне 3 слоя от жизнеспособни епителни клетки и некератинизирана повърхност). За VRM подходяща морфология е определена от разработчика/доставчика, поради което няма нужда да се доказва отново от потребител на метода за изпитване за всяка използвана партида тъкани.

Възпроизводимост

29. Резултатите от положителните и отрицателните контроли на метода за изпитване следва да докажат възпроизводимост във времето.

Контрол на качеството (КК)

30. Тъканият модел на RhCE следва да се използва само ако разработчикът/доставчикът докаже, че всяка използвана партида тъканен модел на RhCE отговаря на определените критерии за пускане в обръщение на продукцията, сред които най-подходящи са тези за жизнеспособност (точка 26) и барьерна функция (вж. точка 27). Интервалът на приемливост (горна и долна граници) за барьерните функции, измерени от ET₅₀ или IC₅₀ (вж. точки 25 и 26) следва да бъдат определени от разработчика/доставчика на тъканния модел на RhCE. Интервалът на приемливост на ET₅₀ и IC₅₀, използван като критерий за КК за освобождаване на партида от разработчика/доставчика на тъканните

модели на RhCE (използвани във VRM), е даден в Таблица 3. Разработчикът/доставчикът на тъканния модел на RhCE трябва да предостави на потребителите на метода за изпитване данни, доказващи съответствие с всички критерии за пускане в обръщение на продукцията, така че те да са в състояние да включат тази информация в протокола за изпитването. Само резултати, получени с тъкани, които отговарят на всички тези критерии за пускане в обръщение на продукцията, могат да бъдат приети като надеждна прогноза за химикали, не изискващи класифициране и етикетиране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите в съответствие с GHS на ООН/CLP.

Таблица 3: Критерии за КК за пускане в обръщение на партида

Тест	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiOcular™ EIT (OCL-200) — VRM1 (100 µl от 0,3% (v/v) Triton X-100)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) — VRM2 (30 минути третиране с 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Прилагане на изпитвания химикал и веществата за контроли

31. За всеки изпитван химикал и за всяко вещество за контрола във всеки експеримент следва да се използват поне две повторения на тъкани. Използват се два различни протокола за третиране, един за течни изпитвани химикали и един за твърди изпитвани химикали (34)(35). И за двата метода и протокола повърхността на тъканния модел следва да се навлажни с фосфатно буфериран физиологичен разтвор на Дюлбеко без калций и магнезий (не съдържащ Ca²⁺/Mg²⁺ DPBS) преди прилагане на изпитваните химикали, за да се имитират влажните условия на човешкото око. Третирането на тъканите започва с експозиция на изпитвания(те) химикал(и) и веществата за контроли. И за двата протокола на третиране в двата VRM следва да се приложи достатъчно количество от изпитвания химикал или веществото за контрола, за да покрие равномерно епителната повърхност, като същевременно се избягва прилагане на неопределена доза (вж. точки 32 и 33) (Допълнение 2).
32. Изпитвани химикали, които могат да се пипетират при 37°C или по-ниски температури (с помощта на пипета с положително изместване, ако е необходимо), се третират като течности във VRM, в противен случай те следва да се третират като твърди вещества (вж. точка 33). Във VRM даден течен изпитван химикал се разпространява равномерно върху тъканната повърхност (т.е. приложение на минимум 60 µl/cm²) (вж. Допълнение 2, (33)(34)). Капилярните ефекти (ефектите на повърхностно напрежение), които може да възникнат поради малките обеми, приложени към вложката (върху тъканната повърхност), следва да се избягват до степента, до която е възможно, за да се

гарантира правилното дозиране на тъканта. Тъканите, третирани с течни изпитвани химикали, се инкубират в продължение на 30 минути при стандартни условия на култивиране ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$, $5\pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ OB). В края на периода на експозиция течният изпитван химикал и веществата за контроли следва внимателно да се отстранят от тъканната повърхност чрез обилно изплакване с DPBS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ при стайна температура. След тази стъпка на изплакване следва потапяне в прясна среда при стайна температура след експозиция (за отстраняване на всяко количество изпитван химикал, абсорбирано в тъканта) в продължение на предварително определен период от време, който варира в зависимост от използвания VRM. Само за VMR1 инкубиране след експозиция в прясна среда при стандартни условия на култивиране се прилага преди извършването на МТТ анализа (вж. Допълнение 2, (34)(35)).

33. Изпитвани химикали, които не могат да бъдат пипетирани при температури до 37°C , се третират като твърди вещества във VRM. Количеството на приложения изпитван химикал следва да е достатъчно, за да покрие цялата повърхност на тъканта, т.е. следва да се приложи минимум 60 mg/cm^2 (Допълнение 2). Когато е възможно, твърдите вещества следва да се изпитват под формата на фин прах. Тъкани, третирани с твърди изпитвани химикали, се инкубират в продължение на предварително определен период от време (в зависимост от използвания VRM) при стандартни условия на култивиране (вж. Допълнение 2, (34) (35)). В края на периода на експозиция твърдият изпитван химикал и веществата за контроли следва внимателно да се отстранят от тъканната повърхност чрез обилно изплакване с DPBS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ при стайна температура. След тази стъпка на изплакване следва потапяне в прясна среда при стайна температура след експозиция (за отстраняване на всяко количество изпитван химикал, абсорбирано в тъканта) в продължение на предварително определен период от време, който варира в зависимост от използвания VRM, инкубирането след експозиция в прясна среда при стандартни условия на култивиране, преди извършването на МТТ анализа (вж. Допълнение 2, (34)(35)).
34. Във всеки експеримент следва да се включват паралелни отрицателни и положителни контроли, за да се докаже, че жизнеспособността (определена с отрицателната контрола) и чувствителността (определена с положителната контрола) на тъканите са в рамките на интервалите на приемливост, определени въз основа на данни от предходни периоди. Паралелната отрицателна контрола осигурява също така изходното ниво (100% тъканна жизнеспособност) за изчисляване на процента относителна жизнеспособност на тъканите, третирани с изпитвания химикал (изпитване за %жизнеспособност). Препоръчителното вещество за положителна контрола, което да се използва за VRM, е чист метил ацетат (CAS № 79-20-9, предлаган на пазара напр. от Sigma-Aldrich, кат. №

45997; течност). Препоръчителните вещества за отрицателна контрола, които да се използват за VRM1 и VRM2, са съответно свръхчиста H_2O и DPBS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Това са веществата за контроли, използвани във валидиращите проучвания на VRM, за които съществуват най-много данни от предходни периоди. Използването на подходящи алтернативни вещества за положителна или отрицателна контрола следва да е оправдано от научна гледка точка по подходящ начин. Отрицателните и положителните контроли следва да се изпитват с един и същ протокол(и) като този(тези), използвани за изпитваните химикали, включени в експеримента (т.е. за течности и/или твърди вещества). След това приложение следва да се извърши третирането, експозицията, изплакването, потапянето след експозиция и инкубирането след експозиция, където е приложимо, както е описано за експериментите с контроли, провеждани паралелно с тези на течни изпитвани химикали (вж. точка 32) или за експериментите с контроли, провеждани паралелно с тези на твърди изпитвани химикали (вж. точка 33), преди извършване на анализа МТТ (вж. точка 35) (34)(35). Един отделен набор от отрицателни и положителни контроли е достатъчен за всички изпитвани химикали с едно и също агрегатно състояние (течности или твърди вещества), включени в същия експеримент.

Измервания на тъканната жизнеспособност

35. Анализът МТТ е стандартизиран метод за количествено определяне (16), който следва да се използва за измерване на тъканната жизнеспособност при настоящия метод за изпитване. Той е съвместим с използване в триизмерни тъканни модели. Анализът МТТ се провежда веднага след периода на инкубиране след експозиция. Във VRM пробата на тъканен модел на RhCE се поставя в 0,3 ml разтвор на МТТ при 1 mg/ml за 180 ± 15 минути при стандартни условия на култивиране. Виталният оцветител МТТ се редуцира в син преципитат на МТТ формазан от жизнеспособните клетки на тъканния модел на RhCE. Утаеният син МТТ формазанов продукт след това се извлича от тъканта с помощта на подходящ обем изопропанол (или подобен разтворител) (34)(35). Тъканите, изпитвани с течни изпитвани химикали, следва да се извличат от горната и долната част на тъканите, докато тъканите, изпитвани с твърди изпитвани химикали и оцветени течности, следва да се извличат само от долната част на тъканта (за да се сведе до минимум всяко потенциално замърсяване на разтвора на изопропанол за извличане с някой изпитван химикал, който може да е останал в тъканта). Тъкани, третирани с течни изпитвани химикали, които не се измиват лесно, също може да се извличат само от долната част на тъканта. Паралелно изпитваните вещества за отрицателна и положителна контрола следва да се третират подобно на изпитвания химикал. Извлеченият МТТ формазан може да се определи количествено или чрез измерване на стандартната абсорбция (OD) при 570 nm с използване на ширина на

филтърната дължина на вълната максимум ± 30 nm, или с помощта на процедура на BETX/UBETX спектрофотометрия (вж. точка 42) (11)(36).

36. Оптичните свойства на изпитвания химикал или неговото химично действие върху МТТ може да взаимодейства с измерването на МТТ формаза, което води до невярна оценка на тъканната жизнеспособност. Изпитваните химикали може да повлияят върху измерването на МТТ формаза чрез пряка редукция на МТТ в син МТТ формаза и/или чрез цвetoва интерференция, ако изпитваният химикал абсорбира, по естествен път или в резултат на процедурите за третиране, в същия диапазон на OD, като МТТ формаза (т.е. около 570 nm). Преди изпитване следва да се извършат предварителни проверки, за да се позволи идентифициране на потенциални преки редуктори на МТТ и/или химикали с цвetoва интерференция, и да се използват допълнителни контроли за откриване и коригиране на потенциалната интерференция на тези изпитвани химикали (вж. точки 37-41). Това е особено важно, когато специфичен изпитван химикал не бъде напълно отстранен от тъканния модел на RhCE чрез изплакване или когато той проникне в наподобяващия роговица епител и поради това присъства в тъканните модели на RhCE, когато се извършва МТТ анализ. За изпитвани химикали, които абсорбират светлина в същия диапазон, като МТТ формаза (по естествен път или след третиране), които не са съвместими с измерването на стандартната абсорбция (OD) на МТТ формаза поради прекалено силна интерференция, т.е. силна абсорбция при 570 ± 30 nm, може да се използва процедура с BETX/UBETX спектрофотометрия за измерване на МТТ формаза (вж. точки 41 и 42) (11)(36). Подробно описание на начина за откриване и коригиране на пряката редукция на МТТ и интерференциите от оцветителите е налично в СОП за VRM (34)(35). Илюстративни диаграми, предоставящи указания за начина на идентифициране и работа с преки редуктори на МТТ и/или химикали с цвetoва интерференция за VRM1 и VRM2 също са предоставени, съответно в Допълнение III и IV.
37. За идентифициране на потенциална интерференция от изпитвани химикали, абсорбиращи светлина в същия диапазон, като МТТ формаза (по естествен път или след третиране), и вземане на решение за нуждата от допълнителни контроли изпитваният химикал се добавя към вода и/или изопропанол и се инкубира в продължение на подходящ период от време при стайна температура (вж. Допълнение 2, (34)(35)). Ако изпитваният химикал във вода и/или изопропанол абсорбира достатъчно светлина в диапазона 570 ± 20 nm за VRM1 (вж. Допълнение 3) или ако при смесване на изпитвания химикал с вода за VRM2 се получава оцветен разтвор (вж. Допълнение 4), приема се, че изпитваният химикал влияе върху измерването на стандартната абсорбция (OD) на МТТ формаза и следва да се използват допълнителни контроли с оцветители

или, като алтернатива, следва да се използва процедура на BETX/UBETX спектрофотометрия, в който случай тези контроли не са необходими (вж. точки 41 и 42 и Допълнения III и IV)(34)(35). Когато се извършва измерване на стандартната абсорбция (OD), всеки изпитван химикал, причиняващ интерференция, следва да се приложи върху поне две повторения на жизнеспособни тъкани, които се подлагат на цялата процедура за изпитване, но по време на етапа на инкубиране на МТТ се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ, за да предизвикат неспецифичен цвят в живите тъкани (NSC_{living}) контрола (34)(35). NSC_{living} контролата трябва да се извърши паралелно с изпитването на оцветения изпитван химикал, а в случай на множество изпитвания трябва да се проведе независима NSC_{living} контрола за всяко извършено изпитване (във всяка серия), поради присъщата биологична изменчивост на живите тъкани. Реалната тъканна жизнеспособност се изчислява като: процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, и инкубирани с разтвор на МТТ (изпитване за процент жизнеспособност) минус процента неспецифичен цвят, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, и инкубирани със среда без МТТ, изпитвани паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{living}), т.е. реалната тъканна жизнеспособност = [изпитване за % жизнеспособност] - [%NSC_{living}].

38. За да се идентифицират преките редуктори на МТТ, всеки изпитван химикал следва да бъде добавен към прясно приготвен разтвор на МТТ. Към МТТ разтвора се добавя подходящо количество от изпитвания химикал и сместа се инкубира в продължение на около 3 часа при стандартни условия на култивиране (вж. Допълнения III и IV)(34)(35). Ако сместа с МТТ, съдържаща изпитвания химика (или суспензия за неразтворими изпитвани химикали) стане синя/лилава, се приема, че изпитваният химикал пряко редуцира МТТ и следва да се извърши допълнителна функционална проверка на нежизнеспособни тъканни модели на RhCE тъкани, независимо от използването на стандартното измерване на коефициента на поглъщане (OD) или BETX/UBETX спектрофотометрична процедура. При тази допълнителна функционална проверка се използват умъртвени тъкани, които имат само остатъчна метаболитна активност, но поглъщат и задържат изпитвания химикал по начин, сходен с този на жизнеспособните тъкани. Умъртвените тъкани на VRM1 се приготвят чрез експозиция на ниска температура („умъртвени чрез замразяване“). Умъртвените тъкани на VRM2 се приготвят чрез удължено инкубиране (напр. поне 24±1 часа) във вода, последвано от съхранение при ниска температура („умъртвени с вода“). Всеки изпитван химикал, редуциращ МТТ, се прилага върху поне две умъртвени тъканни повторения, които се подлагат на цялата процедура за изпитване, за да предизвикат неспецифична

контрола на МТТ редукция (NSMTT) (34)(35). Един NSMTT контрол е достатъчен за всеки изпитван химикал, независимо от броя на изпълнените независими изпитвания/сери. Реалната тъканна жизнеспособност се изчислява като: процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на редуктор на МТТ (изпитване за % жизнеспособност) минус процента неспецифична редукция на МТТ, получена от умъртвени тъкани, изложени на същия редуктор на МТТ, изчислена относително отрицателната контрола, извършена паралелно с изпитването (%NSMTT), т.е. реалната тъканна жизнеспособност = [изпитване за % жизнеспособност] - [%NSMTT].

39. Изпитваните химикали, които се идентифицират като причиняващи цетова интерференция (вж. точка 37) и пряка редукция на МТТ (вж. точка 38), също изискват трети набор от контроли, когато се извършва измерване на стандартната абсорбция (OD), освен NSMTT и NSC_{living} контролите, описани в предходните точки. Обикновено такъв е случаят с тъмно оцветени изпитвани химикали, абсорбиращи светлина в диапазона 570±30 nm (напр., син, лилав, черен), защото техният присъщ цвят пречи на оценката на тяхната способност пряко да редуцират МТТ, както е описано в точка 38. Това налага използването на NSMTT контроли по подразбиране, заедно с NSC_{living} контролите. Изпитваните химикали, за които се извършват NSMTT и NSC_{living} контроли, може да се абсорбират и задържат както от живи, така и от умъртвени тъкани. Поради това, в този случай, NSMTT контролата може не само да коригира потенциала за пряка редукция на МТТ на изпитвания химикал, но и цетовата интерференция, произтичаща от абсорбцията и задържането на изпитвания химикал от умъртвени тъкани. Това би могло да доведе до двойна корекция за цетова интерференция, тъй като NSC_{living} контролата вече коригира цетовата интерференция, произтичаща от абсорбцията и задържането на изпитвания химикал от живи тъкани. За да се избегне възможна двойна корекция за цетова интерференция, трябва да се извърши трета контрола за неспецифичен цвят в умъртвени тъкани (NSC_{killed}) (вж. Допълнения III и IV)(34)(35). При този допълнителен контрол, изпитваният химикал се прилага върху най-малко две умъртвени тъканни повторения, които биват подложени на цялата процедура за изпитване, но по време на етапа за инкубация с МТТ, се инкубират със среда, вместо с разтвор на МТТ. Една NSC_{killed} контрола е достатъчна за всеки изпитван химикал, независимо от броя на извършените независими изпитвания/сери, но трябва да се изпълнява паралелно с NSMTT контролата и с една и съща партида тъкани. Реалната тъканна жизнеспособност се изчислява като: процента на тъканна жизнеспособност, получен от живи тъкани, изложени на изпитвания химикал (изпитване за % жизнеспособност) минус %NSMTT минус %NSC_{living} плюс процента неспецифичен цвят, получен от умъртвени тъкани, изложени на изпитвания химикал, причиняващ интерференция, и инкубирани

със среда без МТТ, изчислена относително отрицателната контрола, извършена паралелно с изпитването, което се коригира (%NSC_{killed}), т.е. реалната тъканна жизнеспособност = [изпитване за % жизнеспособност] - [%NSMTT] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. Важно е да се отбележи, че неспецифичната редукция на МТТ и неспецифичните цветови интерференции могат да повишат OD (когато се извършват измервания на стандартната абсорбция) на извлечената тъкан над линейния диапазон на спектрофотометъра и че неспецифичната редукция на МТТ може също така да увеличи пиковата площ на МТТ формазан (когато се извършват измервания чрез ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия) на извлечената тъкан над линейния диапазон на спектрофотометъра. Предвид това важно е всяка лаборатория да определи линейния диапазон на OD/пиковата площ на техния спектрофотометър, напр. с МТТ формазан (CAS № 57360-69-7), предлаган на пазара от напр. Sigma-Aldrich (кат. № M2003), преди да започне изпитването на изпитвани химикали за регулаторни цели.
41. Измерването на стандартната абсорбция (OD) с помощта на спектрофотометър е подходящо за оценяване на преки редуктори на МТТ и изпитвани химикали, причиняващи цветова интерференция, когато наблюдаваната интерференция при измерването с МТТ формазан не е прекалено силна (т.е. OD на тъканните модели, получени с изпитваните химикали без каквато и да е корекция за пряка редукция на МТТ и/или цветова интерференция, са в рамките на линейния диапазон на спектрофотометъра). Независимо от това, резултатите за изпитвани химикали, предизвикващи %NSMTT и/или %NSC_{living} > 60% (VRM1 и VRM2 за протокола за течности) или 50% (VRM2 за протокола за твърди вещества) на отрицателната контрола, следва да се тълкуват предпазливо, тъй като това е установената гранична стойност, използвана във VRM за разграничаване на класифицирани от неклассифицирани химикали (вж. точка 44). Стандартната абсорбция (OD) обаче не може да се измерва, когато интерференцията с измерването на МТТ формазан е прекалено силна (т.е. водеща до неверни стойности на OD на изпитваните тъканни модели, които попадат извън линейния диапазон на спектрофотометъра). Оцветените изпитвани химикали или изпитвани химикали, които се оцветяват при контакт с вода или изопропанол, и които показват прекалено силна интерференция при измерване на стандартната абсорбция (OD) на МТТ формазан, все пак могат да се оценяват с помощта на ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия (вж. Допълнения III и IV). Това е така, защото ВЕТХ/УВЕТХ системата позволява отделянето на МТТ формазан от химикала преди неговото количествено определяне (36). Поради тази причина никога не се изискват NSC_{living} или NSC_{killed} контроли, когато се използва ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия, независимо от химикала, който се

подлага на изпитване. NSMTT контроли никога не следва да се използват, ако има съмнение, че изпитваният химикал и пряк редуктор на МТТ (спазвайки процедурата, описана в точка 38). NSMTT контроли следва да се използват и с изпитвани химикали с цвят (присъщ или появяващ се, когато са във вода), който пречи на оценката на тяхната способност пряко да редуцират МТТ, както е описано в точка 38. Когато се използва ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия за измерване на МТТ формазан, процентът на жизнеспособност на тъканта се изчислява като процента на пиковата площ на МТТ формазан, получен от живи тъкани, изложени на въздействието на изпитвания химикал спрямо пика на МТТ формазан, получен при паралелната отрицателна контрола. За изпитвани химикали, които са в състояние пряко да редуцират МТТ, реалната тъканна жизнеспособност се изчислява като: $\text{изпитване за \% жизнеспособност} - \% \text{NSMTT}$, както е описано в последното изречение на точка 38. И накрая следва да се отбележи, че преките редуктори на МТТ или преките редуктори на МТТ, които освен това може да причиняват и цвetoва интерференция, които се задържат в тъканите след третиране и толкова силно редуцират МТТ, че водят до стойности на OD (при използване на стандартно измерване на OD) или на пикови площи (при използване на ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия) на изпитваните тъканни модели, които попадат извън линейния диапазон на спектрофотометъра, не могат да се оценяват с методи за изпитване на RhC, въпреки че се очаква подобни случаи да възникват само в изключително редки ситуации.

42. ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия може да се използва с всички видове изпитвани химикали (оцветени, неоцветени, редуктори на МТТ и не-редуктори на МТТ) за измерване на МТТ формазан (11)(36). Поради разнообразието на системите за ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия е невъзможно всеки потребител да определи абсолютно еднакви условия на системата. Предвид това пригодността на системата за ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия следва да бъде доказана преди употребата ѝ за количествено определяне на МТТ формазан от тъканни модели чрез изпълнението на критериите за приемливост по отношение на набор от стандартни параметри, на базата на описаните в насоките на Администрацията по храни и лекарства на САЩ за индустрията по отношение на валидирането на био-аналитични методи (36)(38). Тези ключови параметри и техните критерии за приемливост са посочени в Допълнение 5. След като критериите за приемливост, дефинирани в Допълнение 5, са изпълнени, системата за ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия се счита за пригодна и готова за измерване на МТТ формазан при експерименталните условия, описани в настоящия метод за изпитване.

Критерии за приемливост

43. За всяка серия, използваща партии на RhCE тъкан, които отговарят на качествения контрол (вж. точка 30), тъканите, третирани с вещество за отрицателна контрола, следва да показват OD, отразяваща състоянието на тъканите, които са преминали през етапите по транспортиране и приемане, както и през всички процедури по протокола, и не трябва да попадат извън границите, установени за предходни периоди, които са описани в Таблица 2 (вж. точка 26). По същия начин тъканите, третирани с веществото за положителна контрола, т.е. метил ацетат, следва да показват средна тъканна жизнеспособност $< 50\%$ по отношение на отрицателната контрола във VRM1 според протоколите или за течности, или за твърди вещества, и $\leq 30\%$ (протокол за течности) или $\leq 20\%$ (протокол за твърди вещества) по отношение на отрицателната контрола във VRM2, отразявайки по този начин способността на тъканите да реагират на дразнещ изпитван химикал при условията на метода на изпитване (34)(35). Променливостта между тъканните повторения на изпитвания химикал и контролните вещества следва да попада в рамките на приетите лимити (т.е. разликата в жизнеспособността между две тъканни повторения следва да е по малка от 20% или стандартното отклонение (CO) между три тъканни повторения не следва да превишава 18%). Ако или отрицателната контрола, или положителната контрола, включени в дадена серия, попадат извън приетите граници, серията се счита за не отговаряща на изискванията и следва да се повтори. Ако променливостта между тъканните повторения на изпитван химикал е извън приетия интервал, изпитването трябва да се счита за не отговарящо на изискванията и следва да се повтори изпитването на изпитвания химикал.

Интерпретация на резултатите и модел за прогнозиране

44. Стойностите на OD/пикови площи, получени с репликрани екстракти на тъкан за всеки изпитван химикал, следва да се използват за изчисляване на средния процент на тъканна жизнеспособност (средната стойност на тъканни повторения), нормализирана до отрицателната контрола, която е определена като 100%. Процентната гранична стойност на тъканна жизнеспособност за идентифициране на изпитвани химикали, не изискващи класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите („без категория“ по GHS на ООН и CLP), е дадена в Таблица 4. Резултатите следва да се тълкуват както следва:

- Изпитваният химикал се идентифицира като не изискващ класифициране и етикетиране по GHS на ООН и CLP („без категория“), ако средният процент на тъканна жизнеспособност след експозиция и инкубиране след експозиция е по-голям от(>) установената процентна гранична стойност на тъканна

жизнеспособност, както е посочена в Таблица 4. В този случай не се изисква допълнително изпитване с други методи за изпитване.

- Ако средният процент на тъканна жизнеспособност след експозиция и инкубиране след експозиция е по-малък или равен на ($\leq$) установената процентна гранична стойност на тъканна жизнеспособност, прогноза не може да се направи, както е показано в Таблица 4. В този случай се изисква допълнително изпитване с други методи на изпитване, тъй като методите за изпитване на RhCE демонстрират определен брой неверни положителни резултати (вж. точки 14-15) и не може да се вземе решение за отнасяне към категориите 1 и 2 на GHS на ООН и CLP (вж. точка 17).

Таблица 4: Прогнозни модели съгласно класификацията по GHS на ООН и CLP

VRM	Без категория	Не може да се направи прогноза
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (и за двата протокола)	Средна тъканна жизнеспособност > 60%	Средна тъканна жизнеспособност $\leq$ 60%
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (за протокола за течности)	Средна тъканна жизнеспособност > 60%	Средна тъканна жизнеспособност $\leq$ 60%
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (за протокола за твърди вещества)	Средна тъканна жизнеспособност > 50%	Средна тъканна жизнеспособност $\leq$ 50%

- Едно изпитване на поне две тъканни повторения следва да е достатъчно за даден изпитван химикал, когато полученият резултат е еднозначен. Въпреки това, при наличие на гранични резултати, като несъответстващи измервания на повторения и/или среден процент на тъканна жизнеспособност, равен на $60 \pm 5\%$ (VRM1 и VRM2 за протокола за течности) или на $50 \pm 5\%$ (VRM2 за протокола за твърди вещества), следва да се обмисли провеждане на второ изпитване, както и на трето, в случай на наличие на несъответстващи резултати между първите две изпитвания.
- Може да се обмислят различни процентни гранични стойности на тъканна жизнеспособност, разграничаващи класифицирани от неклассифицирани изпитвани химикали, за специфични видове смеси, където е подходящо и оправдано, за да се увеличи общата ефективност на метода за изпитване за тези видове смеси (вж. точка 14). Химикалите за сравнение може да са полезни за оценяване на потенциала на неизвестен изпитван химикал или продуктово клас за сериозно увреждане на очите/дразнене на очите или за оценка на потенциала за относителна очна токсичност на класифициран химикал в рамките на специфичен диапазон на положителни отговори.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

47. Данните от отделните тъканни повторения в серия (напр. стойности на OD/пикови площи на МТТ формазан и изчислените данни за процент на тъканна жизнеспособност за изпитвания химикал и контролите, както и окончателната прогноза на метода за изпитване на RhCE) следва да се протоколират в табличен вид за всеки изпитван химикал, включително данните от повторени изпитвания, както е подходящо. Освен това средният процент на тъканна жизнеспособност и разликата на променливостта между две тъканни повторения (ако $n=2$ тъканни повторения) или СО (ако $n \geq 3$ тъканни повторения) за всеки отделен изпитван химикал и контрола следва да се протоколира. Всички наблюдавани интерференции на даден изпитван химикал с измерването на МТТ формазан чрез пряка редукция на МТТ и/или цвetoва интерференция следва да се протоколират за всеки изпитван химикал.

Протокол от изпитването

48. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал

Вещества с една съставка

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или CAS, регистрационен(ни) номер(а) по CAS, SMILES или InChI код, структурна формула и/или други идентификатори;
- Агрегатно състояние, летливост, рН, LogP, молекулно тегло, химически клас и допълнителни относими физически и химични свойства, съответстващи на провеждането на проучването, доколкото са налични;
- Чистота, химическа идентичност на примесите, както е целесъобразно и практически осъществимо, *др.*;
- Третиране преди изпитване, ако е приложимо (напр. (напр. затопляне, смилане);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.

Вещества с повече съставки, UVCB и смеси

- характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични;

- Агрегатно състояние и допълнителни относими физически и химични свойства, съответстващи на провеждането на проучването, доколкото са налични;
- Чистота, химическа идентичност на примесите, както е целесъобразно и практически осъществимо, др.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.

Вещества за положителни и отрицателни контроли

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или CAS, регистрационен(ни) номер(а) по CAS, SMILES или InChI код, структурна формула и/или други идентификатори;
- Агрегатно състояние, летливост, молекулно тегло, химически клас и допълнителни относими физически и химични свойства, съответстващи на провеждането на проучването, доколкото са налични;
- Чистота, химическа идентичност на примесите, както е целесъобразно и практически осъществимо, др.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за използването на различна от ултрачиста H₂O или DPBS без Ca²⁺/Mg²⁺ отрицателна контрола, ако е приложимо;
- Обосновка за използването на различна от чист метил ацетат положителна контрола, ако е приложимо;
- Позоваване на резултати за положителни и отрицателни контроли от предходни периоди, демонстриращи подходящи критерии за приемливост на изпитването.

Информация за финансиация и за изпитващата лаборатория

- Име и адрес на финансиация, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването.

Използвани тъканен модел на RhCE и протокол (предоставящи обосновка на избора, ако е приложимо)

Условия на метода за изпитване

- Използван тъканен модел на RhCE, включително номер на партида;
- Дължина на вълната и лента на пропускане (ако е приложимо), използвани за количествено определяне на МТТ формазан, и линеен диапазон на измервателното устройство (напр. спектрофотометър);

- Описание на метода, използван за количествено определяне на МТТ формазан;
- Описание на използваната система за ВЕТХ/УВЕТХ спектрофотометрия, ако е приложимо;
- Пълна придружаваща информация за конкретния използван тъканен модел на RhCE, включително неговите характеристики. това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) Качествен контрол на жизнеспособността (доставчик)
 - ii) Жизнеспособност при условията на метода за изпитване (потребител);
 - iii) Качествен контрол на бариерната функция;
 - iv) Морфология, ако е приложимо;
 - v) Възпроизводимост и способност за прогнозиране;
 - vi) Други качествени контроли (КК) на тъканния модел на RhCE, ако е приложимо;
- Препратка към данни за тъканния модел на RhCE от предходни периоди. това следва да включва, но не се ограничава до: Приемливост на данните за КК с позоваване на данни за партида от предходни периоди;
- Декларация, че изпитващата лаборатория е демонстрирала пригодност за използването на метода за изпитване преди рутинна употреба чрез изпитване на химикали за изпитване за пригодност;

Критерии за приемливост на изпитвана серия и изпитване

- Средни стойности и диапазони на приемливост на положителната и отрицателната контроли въз основа на данни от предходни периоди;
- Допустимо вариране между тъканните повторения за положителни и отрицателни контроли;
- Приемлива променливост между тъканните повторения за изпитвания химикал;

Процедура за изпитване

- подробна информация за използваната процедура на изпитване;
- Използвани дози на изпитвания химикал и контролните вещества;
- Продължителност и температура на експозиция, периоди на потапяне след експозиция и инкубиране след експозиция (където е приложимо);
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- Указание за използваните контроли за преки редуктори на МТТ и/или оцветяващи изпитвани химикали, ако е приложимо;

- Брой на използваните тъканни повторения за всеки изпитван химикал и контроли (положителна контрола, отрицателна контрола, NSMTT, NSCliving и NSCKilled, ако е приложимо);

Резултати

- Представяне в табличен вид на данните за отделните изпитвани химикали и вещества за контроли за всяка серия (включително повторни експерименти, където е приложимо) и за всяко измерване на повторение, включително стойност на OD или пикова площ на MTT формазан, процент на тъканна жизнеспособност, среден процент на тъканна жизнеспособност, разлики между тъканни повторения или СО и окончателна прогноза;
- Ако е приложимо, резултатите от използваните контроли за преки редуктори на MTT и/или оцветяващи изпитвани химикали, включително стойност на OD или пикова площ на MTT формазан, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, разлики между тъканни повторения или СО, окончателен верен процент на тъканна жизнеспособност и окончателна прогноза;
- Резултатите, получени с изпитвания(ите) химикал(и) и веществата за контроли във връзка с определените критерии за приемливост на изпитваната серия и изпитването;
- Описание на други наблюдавани ефекти, напр. оцветяване на тъканите от оцветен изпитван химикал;

Обсъждане на резултатите

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

- (2) Глава Б.5 от настоящото Приложение, Остро дразнещо/корозивно действие върху очите.
- (3) Глава Б.47 от настоящото приложение, Метод за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица за идентификация на вещества с корозивно и дразнещо действие върху очите.
- (4) Глава Б.48 от настоящото приложение, Метод за изпитване с изолирани птичи очи за определяне на i) химикали, причиняващи сериозно увреждане на очите и ii) химикали, не изискващи класифициране за дразнещо действие върху очите или сериозно увреждане на очите.
- (5) Глава Б.61 от настоящото приложение, Метод за изпитване с пропускане на флуоресцеин за идентифициране на химикали с корозивно и силно дразнещо действие върху очите.
- (6) Глава Б.68 от настоящото приложение, Метод за изпитване *In Vitro* на краткотрайна експозиция за идентифициране на i) химикали, причиняващи сериозно увреждане на очите и ii) химикали, не изискващи класифициране за дразнещо действие върху очите или сериозно увреждане на очите.

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване (18).

Химикал за сравнение: Химикал, използван като еталон за сравнение с изпитван химикал. Химикалът за сравнение следва да притежава следните свойства: (i) постоянен и надежден източник (или източници) за неговото идентифициране и характеризиране; (ii) структурно, функционално и/или химично сходство с класа на изпитвания(те) химикал(и); (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

Подход „отдолу нагоре“: поетапен подход, използван за химикали, за които се предполага, че не изискват класифициране и етикетирание за дразнене сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, за които не се изисква класифициране и етикетирание (отрицателни резултати) по отношение на други химикали (положителни резултати).

Химикал: Вещество или смес.

Съответствие: вж. „Точност“.

Роговица: Прозрачната част на предната страна на очната ябълка, която покрива ириса и зеницата и пропуска светлината навътре.

CV: Коефициент на вариация.

Откл.: Отклонение.

ЕИТ: Изпитване за дразнене на очите.

EURL ECVAM: Референтна лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на опитите върху животни.

Дразнене на очите: Предизвикване на промени в очите вследствие на прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, които са напълно обратими в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Обратими ефекти върху очите“ и с „Категория 2 по GHS на ООН/CLP“.

ЕТ₅₀: Необходимото време за експозиция за намаляване на тъканната жизнеспособност с 50% при приложение на химикал за сравнение с определена фиксирана концентрация.

Честота на фалшивонегативните резултати: Пропорцията на всички невярно определени отрицателни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи положителен резултат. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Честота на фалшивопозитивните резултати: Пропорцията на всички невярно определени положителни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи отрицателен резултат. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

HSE: SkinEthic™ човешки роговичен епител.

BETX: Високоэффективна течна хроматография.

IC₅₀: Концентрация, при която химикалът за сравнение намалява жизнеспособността на тъканите с 50% след фиксирано време на експозиция (напр. 30 минути третиране със SDS).

Неопределена доза: Количеството изпитван химикал, приложено върху тъканния модел на RhCE, превишаващо необходимото количество за пълно и равномерно покриване на епителната повърхност.

Необратими въздействия върху очите: Вж. „Сериозно увреждане на очите“.

LLOQ: Долна граница за количествено определяне.

LogP: Логаритъм на коефициента на разпределение октанол-вода

Смес: Смес или разтвор, съставен от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с няколко съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

МТТ: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид; Тиазолил син тетразолиев бромид.

Отрицателна контрола: Проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система и третирана с вещество, за което е известно, че не предизвиква положителен

отклик в изпитваната система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитван химикал, и с други контролни проби, и се използва за определяне на 100%-на тъканна жизнеспособност.

Некласифицирани: химикали, които не са класифицирани за дразнене на очите (категория 2 по GHS на ООН/CLP, категория 2A или 2B по GHS на ООН/CLP) или сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН/CLP). Терминът е взаимозаменяем с „без категория по GHS на ООН/CLP“.

NSC_{killed}: Неспецифичен цвят в умъртвени тъкани.

NSC_{living}: Неспецифичен цвят в живи тъкани.

NSMTT: Неспецифична редукция на MTT.

OD: Оптична плътност.

Стандарти за ефективност: стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, който се счита за валиден от научна гледна точка, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който е по своя механизъм и функционално сходен с валидирания метод. Включени са: i) съществени компоненти на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтни химикали, подбрани между химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (18).

Положителни контроли: Проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система и третирана с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик в изпитваната система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитван химикал, и с други контролни проби. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (18).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повтораемост (18).

Заместващо изпитване: изпитване, предназначено да замести изпитване, което се

използва рутинно и е прието за определяне на опасността и/или оценка на риска, и за което е установено, че предоставя равностойна или по-добра защита на здравето на хората или животните или на околната среда, според приложимото, в сравнение с приетото изпитване за всички възможни изпитвани ситуации и химикали (18).

Възпроизводимост: Съгласуваността между резултатите, получени чрез изследване на един и същ химикал, като се използва един и същ протокол за изпитване (вж. „Повторяемост“) (18).

Обратими въздействия върху очите: Вж. „Дразнене на очите“.

RhCE: Реконструиран, наподобяващ човешка роговица епител.

Серия: Серията се състои от един или повече изпитвани химикали, подложени на паралелно изпитване с отрицателна контрола и с положителна контрола.

SD: Стандартно отклонение.

Чувствителност: делът на всички положителни/активни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (18).

Сериозно увреждане на очите: Предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитвано вещество към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Необратими ефекти върху очите“ и с „Категория 1 по GHS на ООН и CLP“.

Стандартни оперативни процедури (СОП): Официални писмени процедури, които описват подробно как следва да се извършват рутинните и специфичните за изпитване лабораторни операции. Те се изискват от добрата лабораторна практика.

Специфичност: делът на всички негативни/неактивни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на метода за изпитване (18).

Вещество: Химически елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез производствен процес, включително всякакви добавки, необходими за запазване на стабилността му, както и всякакви онечиствания, произтичащи от използваната технология, но с изключение на разтворители, които могат да бъдат отделени, без да се засегне стабилността на веществото или да се промени съставът му.

Изпитване: Единичен изпитван химикал, изпитван паралелно с поне две повторения на тъкан, както е определено в съответната СОП.

Тъканна жизнеспособност: Параметър, измерващ общата активност на клетъчна популация в реконструирана тъкан като тяхната способност да редуцират виталния оцветител МТТ, който, в зависимост от измерената крайна точка и използвания дизайн на изпитване, е свързан с общия брой и/или жизнеспособността на живите клетки.

Подход „отгоре надолу“: Поетапен подход, използван за химикал, за който се предполага, че предизвиква сериозно увреждане на очите, който започва с определянето на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (положителен резултат) по отношение на други химикали (отрицателен резултат).

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Стратегия за поетапно изпитване: Стратегия за поетапно изпитване, която използва методи за изпитване по последователен начин. Цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап на стратегията. Ако потенциалът за опасност/действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване (18).

ULOQ: Горна граница за количествено определяне.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетиране на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

Категория 1 по GHS на ООН и CLP: Вж. „Сериозно увреждане на очите“.

Категория 2 по GHS на ООН и CLP: Вж. „Дразнене на очите“.

„Без категория“ по GHS на ООН и CLP: Химикали, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 по GHS на ООН/ CLP (или категория 2A или 2B по GHS на ООН). Терминът е взаимозаменяем с „некласифицирани“.

УВЕТХ: Ултра високоефективна течна хроматография.

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валиден метод за изпитване: Метод за изпитване, за който се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и който се основава на научно обосновани принципи. Даден метод за изпитване никога не е валиден в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел (18).

Валидиран метод за изпитване: метод за изпитване, за който са извършени изследвания за валидиране за определяне на относимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод за изпитване може да не притежава достатъчно ефективност по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел (18).

VRM: Валидиран референтен метод.

VRM1: EpiOcular™ EIT се счита за валидирания референтен метод 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT се счита за валидирания референтен метод 2.

Процес, основан на тежестта на доказателствата: Процесът на отчитане на силните и слабите страни на различни видове информация за достигане до дадено заключение относно потенциалната опасност на даден химикал, и в подкрепа на това заключение.

Допълнение 2

ОСНОВНИ ИЗПИТВАНИ КОМПОНЕНТИ НА ТЕСТОВЕТЕ RHSE, ВАЛИДИРАНИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХИМИКАЛИ, НЕ ИЗИСКВАЩИ КЛАСИФИЦИРАНЕ И ЕТИКЕТИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНИЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ

Компоненти на теста	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Течности (подлежащи на пипетиране при 37±1°C или по-ниски температури в продължение на 15 минути)	Твърди горива (не подлежат на пипетиране)	Течности и вискозни вещества: (подлежат на пипетиране)	Твърди горива (не подлежат на пипетиране)
Протоколи				
Повърхност на модела	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Брой на тъканни повторения	Най-малко 2 сигнала	Най-малко 2 сигнала	Най-малко 2 сигнала	Най-малко 2 сигнала

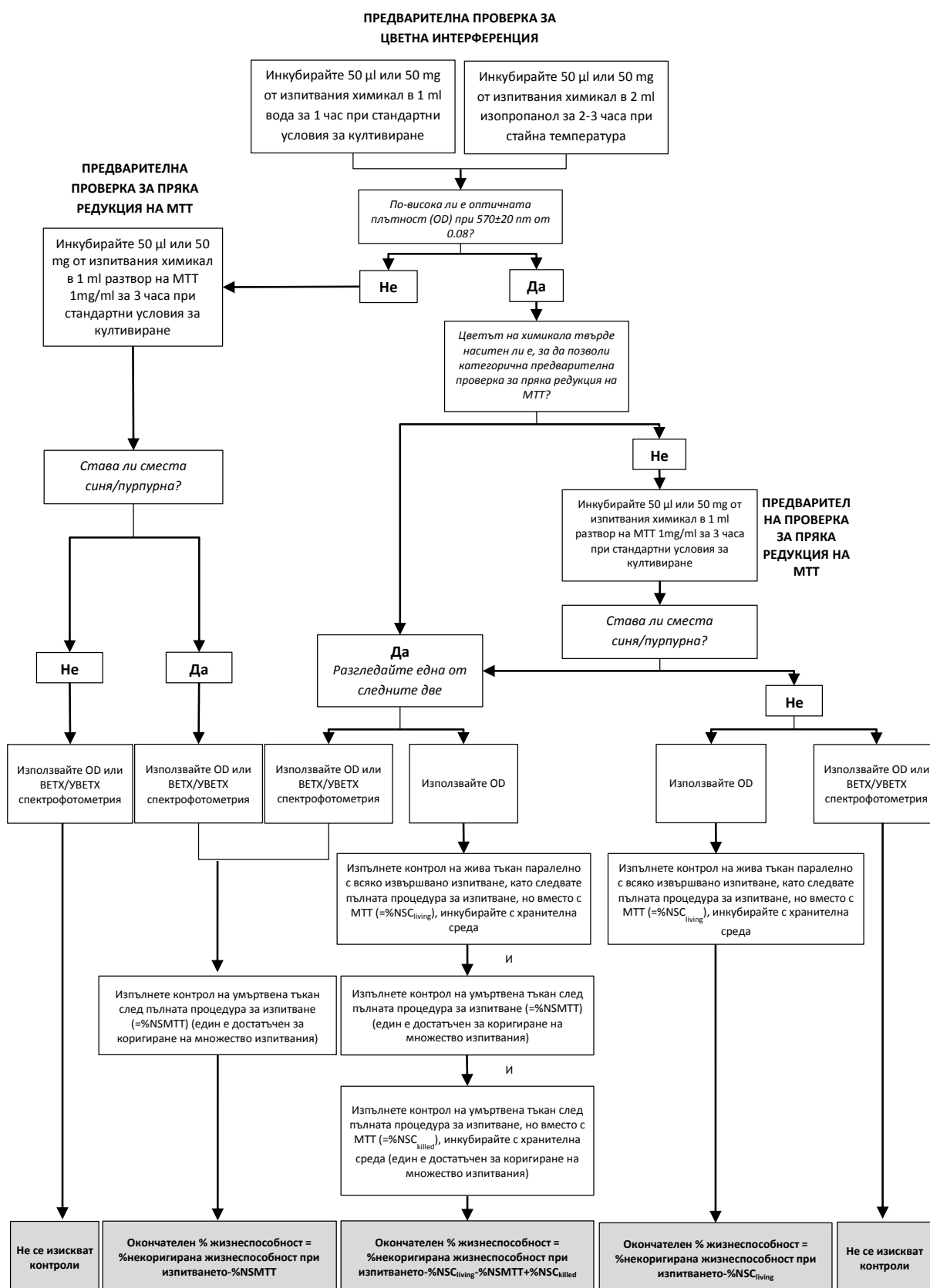
Компоненти на теста	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Предварителна проверка за цветна интерференция	50 µl + 1 ml H₂O в продължение на 60 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB (неоцветени изпитвани химикали) или 50 µl + 2 ml изопропанол, смесен за 2-3 часа при RT (оцветени изпитвани химикали) → ако OD на изпитвания химикал при 570±20 nm, след изваждане на OD за изопропанол или вода, $e > 0,08$ (която отговаря на приблизително 5% от средната OD на отрицателната контрола), трябва да се извършат живи адаптирани контроли.	50 mg + 1 ml H₂O за 60 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB (неоцветен изпитван химикал) и/или 50 mg + 2 ml изопропанол, смесени за 2-3 часа при RT (оцветени и неоцветени изпитвани химикали) → ако OD на изпитвания химикал при 570±20 nm, след изваждане на OD за изопропанол или вода, $e > 0,08$ (която отговаря на приблизително 5% от средната OD на отрицателната контрола), трябва да се извършат живи адаптирани контроли.	10 µl + 90 µl H₂O, смесени за 30±2 min при стайна температура (RT, 18-28°C) → ако изпитваният химикал се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли	10 mg + 90 µl H₂O, смесени за 30±2 min при RT → ако изпитваният химикал се оцвети, трябва да се проведат живи адаптирани контроли
Предварителна проверка за пряка редукция на МТТ	50 µl + 1 ml МТТ 1 mg/ml разтвор за 180±15 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB → ако разтворът стане син/лилав, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени чрез замразяване (50 µl стерилна дейонизирана вода в разтвор на МТТ се използва като отрицателна контрола)	50 mg + 1 ml МТТ 1 mg/ml разтвор за 180±15 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB → ако разтворът стане син/лилав, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени чрез замразяване (50 µl стерилна дейонизирана вода в разтвор на МТТ се използва като отрицателна контрола)	30 µl + 300 µl МТТ 1 mg/ml разтвор за 180± 15 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB → ако разтворът стане син/лилав, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени с вода (30 µl стерилна дейонизирана вода в разтвор на МТТ се използва като отрицателна контрола)	30 mg + 300 µl МТТ 1 mg/ml разтвор за 180± 15 min при 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥95% OB → ако разтворът стане син/лилав, трябва да се проведат адаптирани контроли, умъртвени с вода (30 µl стерилна дейонизирана вода в разтвор на МТТ се използва като отрицателна контрола)

Компоненти на теста	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
предварителна обработка	20 µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ за 30 ± 2 min при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB, със защита от светлина.	20 µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ за 30±2 min при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB, със защита от светлина.	-	-
Дози за третиране и приложение	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) с използване на калибриран инструмент (напр. равна супена лъжица, калибрирана да носи 50 mg натриев хлорид).	10 µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) За вискозни вещества използвайте найлонова мрежа	30 µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Експозиция време и температура	30 min (± 2 min) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	6 часа (± 0,25 ч.) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	30 min (± 2 min) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	4 часа (± 0,1 ч.) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB
Изплакване на стайна температура	3 пъти в 100 ml DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3 пъти в 100 ml DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Потапяне след експозиция	12 min (± 2 min) при RT в среда за отглеждане	25 min (± 2 min) при RT в среда за отглеждане	30 min (± 2 min) при 37°C, 5% CO ₂ , 95% OB, в среда за отглеждане	30 min (± 2 min) при RT в среда за отглеждане
Инкубиране след експозиция	120 min (± 15 min) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	18 ч. (± 0,25 ч.) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	Няма	18 ч. (± 0,5 ч.) в среда за отглеждане при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB
Отрицателна контрола	50 µl H ₂ O Изпитвана паралелно	50 µl H ₂ O Изпитвана паралелно	30 ± 2µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Изпитвана паралелно	30 ± 2µl DPBS без Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Изпитвана паралелно
Положителна контрола	50 µl метил ацетат Изпитвана паралелно	50 µl метил ацетат Изпитвана паралелно	30 ± 2µl метил ацетат Изпитвана паралелно	30 ± 2µl метил ацетат Изпитвана паралелно
Разтвор на МТТ	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml

Компоненти на теста	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Инкубация на МТТ време и температура	180 min (± 15 min) при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	180 min (± 15 min) при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	180 min (± 15 min) при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB	180 min (± 15 min) при 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% OB
Екстрахиращ разтворител	2 ml изопропанол (екстракция от горната и долната част на вложката чрез пробиване на тъканта)	2 ml изопропанол (екстракция от долната част на вложката чрез пробиване на тъканта)	1,5 ml изопропанол (екстракция от горната и долната част на вставката)	1,5 ml изопропанол (екстракция от долната част на вложката)
Време и температура на екстракция	2-3 ч. с разклащане (~120 rpm) при RT или през нощта при 4-10°C	2-3 ч. с разклащане (~120 rpm) при RT или през нощта при 4-10°C	4 ч. с разклащане (~120 rpm) при RT или поне през нощта без разклащане при 4-10°C	Поне 2 ч. с разклащане (~120 rpm) при RT
Показание за оптична плътност	570 nm (550 - 590 nm) без еталонен филтър	570 nm (550-590 nm) без еталонен филтър	570 nm (540 - 600 nm) без еталонен филтър	570 nm (540 - 600 nm) без еталонен филтър
Контрол на качеството на тъканта	Третиране с 100 µl 0,3% (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Третиране с 100 µl 0,3% (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30 min третиране със SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 min третиране със SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml
Критерии приемливост	1. Средната OD на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (NaCl), трябва да е > 0,8 и < 2,5 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 30 минути на положителната контрола, изразена като % от отрицателната контрола, следва да е < 50% 3. Разликата в жизнеспособността между двете тъканни повторения следва да е по-малка от 20%.	1. Средната OD на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола (NaCl), трябва да е > 0,8 и < 2,5 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 6 часа на положителната контрола, изразена като % от отрицателната контрола, следва да е < 50% 3. Разликата в жизнеспособността между двете тъканни повторения следва да е по-малка от 20%.	1. Средната OD на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола, следва да е > 1,0 и ≤ 2,5 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 30 минути на положителната контрола, изразена като % от отрицателната контрола, следва да е ≤ 30% 3. Разликата в жизнеспособността между двете тъканни повторения следва да е по-малка от 20%.	1. Средната OD на тъканните повторения, третирани с отрицателната контрола, следва да е > 1,0 и ≤ 2,5 2. Средната жизнеспособност на тъканните повторения, изложени за 4 часа на положителната контрола, изразена като % от отрицателната контрола, следва да е ≤ 20% 3. Разликата в жизнеспособността между двете тъканни повторения следва да е по-малка от 20%.

Допълнение 3

ИЛЮСТРАТИВНИ ДИАГРАМИ, ПРЕДОСТАВЯЩИ УКАЗАНИЯ ЗА НАЧИНА НА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И РАБОТА С ПРЕКИ РЕДУКТОРИ НА МТТ И/ИЛИ ХИМИКАЛИ С ЦВЕТОВА ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ВЪЗ ОСНОВА НА СОП ЗА VRM1



Допълнение 4

ИЛЮСТРАТИВНИ ДИАГРАМИ, ПРЕДОСТАВЯЩИ УКАЗАНИЯ ЗА НАЧИНА НА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И РАБОТА С ПРЕКИ РЕДУКТОРИ НА МТТ И/ИЛИ ХИМИКАЛИ С ЦВЕТОВА ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ВЪЗ ОСНОВА НА СОП ЗА VRM2

Допълнение 5

КЛЮЧОВИ ПАРАМЕТРИ И КРИТЕРИИ ЗА ПРИЕМЛИВОСТ ЗА ОДОБРЯВАНЕ НА СИСТЕМА ЗА ВЕТХ/УВЕТХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА МТТ ФОРМАЗАН, ИЗВЛЕЧЕН ОТ ТЪКАННИ МОДЕЛИ НА RhCE

Параметър	Протокол, извлечен от Ръководството на FDA (36)(38)	Критерии за приемливост
Избирателност	Анализ на изопропанол, жива празна проба (изопропанолов екстракт от живи тъканни модели на RhCE, без каквото и да е третиране), мъртва празна проба (изопропанолов екстракт от умъртвени тъканни модели на RhCE, без каквото и да е третиране) и на оцветител (напр. метиленово синьо)	Площ на интерференция $\leq$ 20% от площта _{LLOQ} ¹
Прецизност	Качествени контроли (т.е., МТТ формазан с концентрация 1.6 µg/ml, 16 µg/ml и 160 µg/ml) в изопропанол (n=5)	CV $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ
Точност	Качествени контроли в изопропанол (n=5)	%откл. $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ
Матричен ефект	Качествени контроли в жива празна проба (n=5)	85% $\leq$ %матричен ефект $\leq$ 115%
Процент на пренасяне	Анализ на изопропанол съгласно ULOQ ² стандарта	Площ интерференция $\leq$ 20% от площта _{LLOQ}
Възпроизводимост (в рамките на деня)	3 независими калибрационни криви (базирани на 6 последователни 1/3 разреждания на МТТ формазан в изопропанол, като се започне от ULOQ, т.е., 200 µg/ml); Качествени контроли в изопропанол (n=5)	Калибрационни криви: %откл. $\leq$ 15% или $\leq$ 20% за LLOQ Качествени контроли: %откл. $\leq$ 15% и CV $\leq$ 15%
Възпроизводимост (между различни дни)	Ден 1 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 2 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3) Ден 3 1 калибрационна крива и качествени контроли в изопропанол (n=3)	
Краткосрочна стабилност на МТТ формазан в тъканен екстракт на RhCE	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след 24 часа съхранение при стайна температура	
Дългосрочна стабилност на МТТ формазан в тъканен екстракт на RhCE, ако се изисква	Качествени контроли в жива празна проба (n=3), анализирана в деня на приготвяне и след няколко дни съхранение при -20°C	%откл. $\leq$ 15%

¹ LLOQ: Долна граница на количествено определяне, дефинирана да обхваща 1-2% тъканна жизнеспособност, т.е. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: Горна граница на количествено определяне, дефинирана да бъде поне два пъти по-висока от най-високата очаквана концентрация на МТТ формазан в изопропанолови екстракти от отрицателни контроли (~ 70 µg/ml във VRM) т.е. 200 µg/ml.

Б.70 ИЗПИТВАНИЯ *IN VITRO* НА ЧОВЕШКИ РЕКОМБИНАНТЕН ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР (hrER) ЗА ОТКРИВАНЕ НА ХИМИКАЛИ С АФИНИТЕТ НА СВЪРЗВАНЕ С ER

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

Насоки за изпитване на ОИСП, базирани на ефективност

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 493 (2015). TG 493 представляват насоки за изпитване, базирани на ефективност (PBTG), които описват методологията за човешки рекомбинантни *in vitro* изследвания за откриване на вещества с афинитет за свързване на естрогенен рецептор (изпитвания за hrER свързване). Състоят се от две механистични и функционално сходни изследвания за идентифициране на свързващи естрогенен рецептор (т.е. ER α) вещества и следва да улеснят разработването на нови подобни или модифицирани изследвания в съответствие с принципите за валидиране, установени в Ръководството на ОИСП относно валидирането и международното приемане на нови или актуализирани методи за изпитване за оценка на опасности (1). Напълно валидираните референтни методи за изпитване (допълнение 2 и допълнение 3), които осигуряват основата за настоящите PBTM са:

- Изследването *In Vitro* за свързване на естрогенен рецептор (ER) на Freyberger-Wilson (FW), използващо цялостен човешки рекомбинантен ER α (2), и
- Изследването *In Vitro* за свързване на естрогенен рецептор на Изследователския институт за оценка на химикали (CERI), използващо човешки рекомбинантен лиганд-свързващ домейн на протеин (2).

Съществуват стандарти за ефективност (PS) (3), които улесняват разработката и валидирането на подобни методи за изпитване за същата крайна точка на опасност и позволяват своевременно изменение на PBTG 493, така че нови сходни изследвания да могат да бъдат добавени към актуализираните PBTG. Въпреки това сходни изследвания ще се добавят само след преглед и съгласуване от ОИСП, че отговарят на стандартите за ефективност. Включените в TG 493 изследвания могат да се използват, за да се изпълнят изискванията на държавите членки на ОИСП за резултати от изпитвания относно свързване на естрогенен рецептор, като същевременно се възползват от предимствата на взаимното признаване на данни на ОИСП.

Контекст и принципи на изследванията, включени в настоящия метод за изпитване

2. През 1998 г. ОИСП инициира дейност с висок приоритет за преразглеждане на съществуващите и разработване на нови насоки за изпитване при провеждане на скрининг и изпитване на химикали, които имат потенциала да нарушават функциите на ендокринната система. Концептуалната рамка (КР) на ОИСП за изпитване и

оценяване на химикали, които имат потенциала да нарушават функциите на ендокринната система бе преразгледана през 2012 г. Оригиналната и преразгледаната КР са включени в приложенията към Ръководството относно стандартизираните насоки за изпитване за оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система (4). КР обхваща пет нива, като всяко ниво отговаря на различно ниво на биологична комплексност. Изследванията за свързване на ЕР, описани в настоящия метод на изпитване, са от ниво 2, което включва „*in vitro* изследвания, осигуряващи данни за избран(и) ендокринен(ни) механизъм(ми)/път(ица)“. Този метод на изпитване е за изследвания *in vitro* на свързването към рецептори, предназначени да идентифицират лиганди за човешкия естрогенен рецептор алфа (ER α).

3. Уместността на изследването *in vitro* на свързването към ЕР по отношение на биологичните функции е доказана ясно. Изследванията на свързването към ЕР са предназначени да идентифицират химикали, които имат потенциала да нарушат пътя на естрогена, и са използвани широко през последните две десетилетия с цел да се характеризира разпределението на ЕР в тъканите, както и да се идентифицират агонисти/антагонисти на ЕР. Тези изследвания отразяват взаимодействието лиганд-рецептор, което е първоначалната стъпка на сигналния път на естрогена и е от съществено значение за репродуктивната функция при всички гръбначни животни.
4. Взаимодействието на естрогените с ЕР може да окаже въздействие върху транскрипцията на естроген-контролираните гени и да предизвика негеномни ефекти, които могат да причинят индуциране или инхибиране на клетъчни процеси, включително тези, които са необходими за клетъчната пролиферация, нормалното развитие на зародиша и репродуктивната функция (5)(6)(7). Смушението на функцията на нормалните естрогенни системи може да причини евентуални неблагоприятни ефекти върху нормалното развитие (онтогенеза), репродуктивното здраве и целостта на репродуктивната система. Неподходящото сигнализиране на ЕР може да доведе до ефекти като повишен риск от хормонозависим рак, увредена плодовитост и изменения в растежа и развитието на зародиша (8).
5. Изследванията *in vitro* на свързването са базирани на пряко взаимодействие на вещество със специфично място за свързване на рецептор и лиганд, което регулира генната транскрипция. Основният компонент на изследването на свързването към рекомбинантния човешки естрогенен рецептор алфа (hrER α) измерва способността на радиомаркиран лиганд ([^3H]17 β -естрадиол) да се свързва с ЕР в присъствието на нарастващи концентрации на изпитван химикал (т.е. конкурент). Изпитваните химикали, които имат висок афинитет към ЕР, се конкурират с радиомаркирания лиганд при по-ниска концентрация в сравнение с химикалите с по-нисък афинитет към рецептора. Това изследване се състои от два основни компонента: експеримент за свързване до насищане с цел характеризиране на параметрите на

взаимодействието рецептор-лиганд и документиране на специфичността на ЕР, последван от експеримент за конкурентно свързване, който характеризира конкуренцията между изпитван химикал и радиомаркиран лиганд за свързване към ЕР.

6. Валидационните изпитвания на CER1 и изследванията за свързване на FW са доказали своята приложимост и надеждност спрямо предназначението си (2).
7. Използваните определения и съкращения в рамките на настоящия метод за изпитване са описани в допълнение 1.

Обхват и ограничения, свързани с изследванията на свързването към рецептор

8. Тези изследвания се предлагат за целите на скрининг изпитвания и определяне на приоритети, но могат да предоставят и информация за молекулно инициращо събитие (МИС), която може да се използва при подход, при който се отчита значимостта на доказателствения материал. Те се занимават с химичното свързване към областта на ER α за свързване с лиганд в *in vitro* система. Поради това резултатите не бива да бъдат директно екстраполирани към комплексното сигнализиране и регулиране на здравата ендокринна система *in vivo*.
9. Свързването на естествения лиганд 17 β -естрадиол е първоначалната стъпка от поредица молекулни събития, която активира транскрипцията на прицелните гени и накрая кулминира с физиологична промяна (9). Поради тази причина свързването към областта на ER α за свързване на лиганд се разглежда като един от ключовите механизми за опосредстваното от ЕР нарушение на функциите на ендокринната система (ED), въпреки че има и други механизми, чрез които може да възникне ED, включително i) взаимодействия с места от ER α , различни от мястото за свързване с лиганд, ii) взаимодействия с други рецептори, относими спрямо естрогенното сигнализиране, ER β и G-протеин свързан естрогенен рецептор, други рецептори и ензимни системи в рамките на ендокринната система, iii) синтез на хормони, iv) метаболитно активиране и/или деактивиране на хормони, v) разпределение на хормони в прицелните тъкани и vi) клирънс на хормони от организма. Нито едно от изследванията съгласно този метод на изпитване не се занимава с тези режими на действие.
10. Настоящият метод на изпитване се занимава със способността на вещества да се свързват с човешкия ER α и не разграничава между агонисти или антагонисти на ER α . Тези изследвания не се занимават и с по-нататъшни събития по веригата, като транскрипция на гени или физиологични промени. Като се има предвид, че по време на валидацията са използвани само единични вещества с една съставка, приложимостта върху изпитвани смеси не е разглеждана. Независимо от това, изследванията са теоретично приложими за изпитването на вещества с повече

съставки и на смеси. Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

11. Безклетъчните рецепторни системи нямат вътрешно присъща метаболитна способност и не са валидирани в съчетание с метаболитни ензимни системи. Въпреки това би могло да е възможно метаболитната дейност да се включи в проект на проучване, но за целта ще е необходимо допълнително валидиране.
12. Химикали, които могат да денатурират протеина (т.е. протеина на рецептора), като повърхностно активни вещества или химикали, които могат да променят рН на буфера, използван в изследването, не могат да се изпитват или могат да се изпитват единствено при концентрации, при които не протичат такива взаимодействия. В противен случай концентрационният диапазон, който може да се изпита в изследванията за изпитван химикал, се ограничава от разтворимостта му в буфера, използван в изследването.
13. За информационни цели таблица 1 предоставя резултатите от изпитване за 24-те вещества, които бяха изпитани в рамките на двете напълно валидирани изследвания, описани в настоящия метод на изпитване. От тези вещества, въз основа на публикуваните протоколи, 17 се класифицират като свързващи вещества към ЕР, а 6 са несвързващи вещества, включително при *in vitro* изследвания за транскрипционно активиране на ЕР и/или утеротрофичното изследване (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Познавайки се на данните, обобщени в таблица 1, беше наблюдавано почти 100% съвпадение на резултатите от двете изследвания по отношение на класифицирането на всички вещества до 10^{-4}M , като всяко вещество беше класифицирано правилно като свързващо или несвързващо вещество към ЕР. Допълнителна информация за тази група вещества, както и за допълнителните вещества, изпитвани в рамките на изследванията за свързване към ЕР по време на изследванията за валидиране, е предоставена в Стандартите за ефективност за изследването за свързване към hrER (3), допълнение 2 (таблици 1, 2 и 3).

Таблица 1: Класифициране на веществата като свързващи или несвързващи вещества към ЕР при изпитване в изследванията за свързване към hER на FW и CER1 в сравнение с очакван отклик

	Наименование на веществото	CAS №	Очакван отклик	Изследване на FW		Изследване на CER1		Химичен клас в MESH	Продуктов клас
				Концентрационен диапазон (M)	Класифициране	Концентрационен диапазон (M)	Класифициране		
1	17β-Естрадиол	50-28-2	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Свързващо вещество	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
2	Норетинодрел	68-23-5	Свързващо вещество	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Свързващо вещество	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Свързващо вещество	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
3	Норетиндрон	68-22-4	Свързващо вещество	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Свързващо вещество	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Свързващо вещество	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
4	Ди-п-бутил фталат	84-74-2	Несвързващо вещество*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество**	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество**	Въглеродород (цикличен), естер	Пластификатор, междинен химикал
5	Диетилстилбестрол	56-53-1	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (цикличен), фенол	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
6	17α-етинилестрадиол	57-63-6	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
7	Мезохексестрол	84-16-2	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (цикличен), фенол	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
8	Генищайн	446-72-0	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (хетероцикличен), флавоноид	Природен продукт
9	Екуол	531-95-3	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Метаболит на фитоестроген	Природен продукт
10	Бутил парабен (п-бутил-4-хидроксипарабенат)	94-26-8	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Парабен	Консервант
11	Нонилфенол (смес)	84852-15-3	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Алкилфенол	Междинно съединение
12	o,p'-ДДТ	789-02-6	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Органохлор	Инсектицид
13	Химикал	50-22-6	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	Стероид	Природен продукт
14	Зеараленон	17924-92-4	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (хетероцикличен), лактон	Природен продукт

15	Тамоксифен	10540-29-1	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
16	5 α -дихидротестостерон	521-18-6	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Стероид, нефенолен	Природен продукт
17	Бисфенол А	80-05-7	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Фенол	Междинен химикал
18	4- <i>n</i> -хептилфенол	1987-50-4	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Нееднозначно вещество ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Алкилфенол	Междинно вещество
19	Кепон (Хлордекон)	143-50-0	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Въглеродород (халогениран)	Пестицид
20	Бенз(а)антрацен	56-55-3	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Несвързващо вещество ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Несвързващо вещество ^b	Ароматен въглеродород	Междинно вещество
21	Ентеролактон	7847-3-	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Свързващо вещество	Фитоестроген	Природен продукт
22	Прогестерон	57-83-0	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	Стероид	Природен продукт
23	Октилтриетоксилан	2943-75-1	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Несвързващо вещество	Силан	Модификатор на повърхност
24	Атразин	1912-24-9	Несвързващо вещество*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Несвързващо вещество	Хетероциклично съединение	Хербицид

*Граница на разтворимост < 1×10^{-4} М.

^aИзползването и класифицирането на ди-*n*-бутил фталат (ДБФ) като несвързващо вещество се основава на изпитване до 10^{-4} М, тъй като в някои лаборатории по време на предварителните изследвания за валидиране се наблюдава, че веществото е неразтворимо при 10^{-3} М (например помътняване).

[†] По време на изследването за валидиране ди-*n*-бутил фталат (ДБФ) е изпитван като кодирано изпитвано вещество при концентрации до 10^{-3} М. При тези условия някои лаборатории наблюдаваха намаляване на свързването на радиомаркирания лиганд при най-високата концентрация (10^{-3} М) и/или двусмислено налагане на кривата. За тези серии ДБФ беше класифициран като „нееднозначно вещество“ или „свързващо вещество“ в 3/5 лаборатории, използващи изследването на CER1, и 5/6 лаборатории, използващи изследването на FW (вж. справка (2), раздели IV.B.3а,б и VI.A).

^a Класифицирането не беше в съответствие с очакваното класифициране. Класифицирането на 4-*n*-хептилфенол като „нееднозначно вещество“ или „несвързващо вещество“ от 3/5 лаборатории доведе до осреднено класифициране като „нееднозначно вещество“. При по-задълбочен анализ стана ясно, че това се дължи на химични ограничения на разтворимостта, които са възпрепятствали произвеждането на пълна крива на свързване.

^b По време на изследването за валидиране бенз(а)антрацен беше прекласифициран като несвързващо вещество (т.е. отрицателно) въз основа на публикувана литература, в която се доказва, че отчетената естрогенна активност *in vitro* на това вещество(16) зависи основно от метаболитното му активиране(17)(18). Ензимното метаболитно активиране на веществото не би било очаквано в безклетъчните изследвания на свързването към hrER, които са използвани в настоящото между изследване за валидиране. Поради тази причина правилното класифициране на това вещество е „несвързващо“, когато се използва при експерименталните условия за изследванията на FW и CER1.

КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА СВЪРЗВАНЕ КЪМ hrER

Съществени компоненти на изследването

14. Настоящият метод на изпитване се прилага за изследвания, при които се използва рецептор ER и достатъчно силен лиганд за рецептора, който може да се използва като маркер за изследването и да бъде изместен от нарастващи концентрации на изпитван

химикал. Изследванията за свързване съдържат следните два основни компонента: 1) свързване до насищане и 2) конкурентно свързване. Изследването за свързване до насищане се използва за потвърждаване на специфичността и активността на рецепторните препарати, докато експериментът за конкурентно свързване се използва за оценяване на способността на изпитван химикал да се свързва с hrER.

Контроли

15. Следва да се опише основанието за предлагания паралелен референтен естроген и контроли. Паралелните контроли (разтворител (носител), положителни (свързващо вещество към ER; силен и слаб афинитет), отрицателни (несвързващо вещество)), според случая, служат за индикация, че изследването се изпълнява съгласно условията за изпитване, и осигуряват база за сравнения между отделните експерименти; те обикновено са част от критериите за приемливост за даден експеримент (1). Пълните криви на концентрация за референтния естроген и контролите (т.е. слабо свързващо вещество и несвързващо вещество) следва да се използват в една плака по време на всяка серия. Всички останали плаки следва да съдържат: 1) висока (приблизително пълно изместване на радиомаркиран лиганд) и средна (приблизително IC_{50}) концентрация на E2 и слабо свързващо вещество в по три повторения; 2) контрола на разтворителя и неспецифично свързване в по три повторения.

Стандартни процедури за контрол на качеството

16. Стандартните процедури за контрол на качеството следва да се изпълняват, както е описано за всяко изследване, за да се гарантира, че активните рецептори, правилните концентрации на химикалите, границите на допустими отклонения остават стабилни при множество повторения и съхраняват способността си да предоставят очакваните отклик за свързване към ER във времето.

Доказване на пригодността на лабораторията

17. Преди изпитване на неизвестни химикали с което и да било от изследванията в рамките на настоящия метод на изпитване, всяка лаборатория следва да докаже пригодността си за използване на изследването, като извърши изследвания за насищане, за да потвърди специфичността и активността на препарата на ER, и изследвания за конкурентно свързване с референтния естроген и контролите (слабо свързващо вещество и несвързващо вещество). Лабораторията следва да създаде историческа база данни с резултатите за референтния естроген и контролите, генерирани от 3—5 независими експеримента, проведени в различни дни. Тези експерименти ще бъдат основата за референтния естроген и контролите за предходни периоди за лабораторията и ще се използват като частична оценка на приемливостта на изследването за бъдещи серии.
18. Способността за реагиране на изпитващата система ще бъде потвърдена и чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност, изброени в таблица 2. Списъкът

на веществата за изпитване за пригодност е под-множество на референтните вещества, посочени в Стандартите за ефективност за изследванията за свързване към ЕР (3). Тези вещества могат да се намерят в търговската мрежа, представляват класове химикали, които обикновено се асоциират с активността при свързване към ЕР, проявяват подходящ диапазон на ефикасност, очакван за свързването към ЕР (т.е. силни до слаби) и за несвързващите вещества (т.е. отрицателни контроли). За всяко вещество за изпитване за пригодност изпитваните концентрации следва да покриват диапазона, посочен в таблица 2. Следва да се извършат най-малко три експеримента за всяко вещество и резултатите следва да съответстват на очакваната химична активност. Всеки експеримент следва да се проведе независимо (т.е. с пресни разредени разтвори на рецептора, химикалите и реактивите), като за всяка концентрация се правят по три повторения. Пригодността се доказва чрез правилното класифициране (положително/отрицателно) на всяко опитно вещество. Изпитването за пригодност следва да бъде проведено от всеки техник, когато се запознава с изследванията.

Таблица 2: Списък на контролите и веществата за изпитване за пригодност за изследванията за конкурентно свързване към hER¹

№	Наименование на веществото	CAS RN ²	Очакван отклик ^{3,4}	Изпитван концентрационен диапазон (M)	Химичен клас в MeSH ⁵	Продуктов клас ⁶
Контроли (референтен естроген, слабо свързващо вещество, несвързващо вещество)						
1	17- Σ - $\square$ TM LL	50-28-2	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
2	Норетинодрел (или) Норетиндрон	68-23-5 (или) 68-22-4	Свързващо вещество	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
3	Октилтриетоксисилан	2943-75-1	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Силан	Модификатор на повърхността
Опитни вещества⁶						
4	Диетилстилбестрол	56-53-1	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Въглеродород (цикличен), фенол	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
5	17 α -етинилестрадиол	57-63-6	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Стероид	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
6	Мезо-хексестрол	84-16-2	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Въглеродород (цикличен), фенол	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
7	Тамоксифен	10540-29-1	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Въглеродород (цикличен)	Фармацевтичен продукт, ветеринарен агент
8	Генищайн	446-72-0	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Хетероциклично съединение, флавоноид	Природен продукт
9	Бисфенол А	80-05-7	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Фенол	Междинен химикал
10	Зеаралонон	17924-92-4	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Хетероциклично съединение, лактон	Природен продукт

11	Бутил парабен	94-26-8	Свързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Карбоксилна киселина, фенол	Консервант
12	Атразин	1912-24-9	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Хетероциклично съединение	Хербицид
13	Ди-п-бутилфталат (ДБФ) ⁷	84-74-2	Несвързващо вещество ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Въглеродород (цикличен), естер	Пластификатор, междинен химикал
14	Химикал	50-22-6	Несвързващо вещество	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Стероид	Природен продукт

1 Ако дадено вещество за изпитване за пригодност вече не се предлага в търговската мрежа, може да се използва вещество със същата класификация на свързване към ЕР, сравнима ефикасност и химичен клас.

2 Съкращения: CAS RN = номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS)

3 Класифициране като свързващо или несвързващо вещество към ЕР α по време на изследването за валидиране за изследванията за свързване към hrER на CER1 и FW (2).

⁴ Активността за свързване към ЕР се основава на информацията в Информационните документи за преглед (BRD) на ICCVAM за изследванията за свързване към ЕР и изследванията за ТА (9), както и на емпиричните данни и друга информация, получени от публикуваните и рецензирани справочни проучвания (10)(11)(12)(13)(14)(15).

⁵ Веществата бяха причислени към един или повече химични класове въз основа на Медицинските предметни рубрики (MeSH) на Националната библиотека по медицина на САЩ — международно призната стандартизирана схема за класификация (налична на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Веществата бяха причислени към един или повече продуктови класове въз основа на Базата данни на опасните вещества на Националната библиотека по медицина на САЩ (налична на адрес: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ ДБФ може да се използва като заместващо контролно несвързващо вещество, като се изпитва при максимална концентрация 10^{-4} М.

⁸ Границата на разтворимост за това вещество е 10^{-4} М. Използването и класифицирането на ди-п-бутил фталат (ДБФ) като несвързващо вещество се основава на изпитване до 10^{-4} М, тъй като в някои лаборатории по време на предварителните изследвания за валидиране се наблюдава, че веществото е неразтворимо при 10^{-3} М (например помътняване).

Изпитване на разтворимостта и установяване на концентрационния диапазон за изпитваните химикали

19. Следва да се проведе предварително изпитване, за да се определи границата на разтворимост за всеки изпитван химикал и да се идентифицира подходящия концентрационен диапазон за използване при провеждането на изпитването. Границата на разтворимост на всеки изпитван химикал трябва първо да се определи в разтворителя и допълнително да се потвърди при условията на изследването. Крайната концентрация, изпитвана в изследването, не трябва да надвишава 1 mM. Изпитването за установяване на диапазона включва контрола на разтворител заедно с осем логаритмични последователни разреждания, започвайки с максималната приемлива концентрация (напр. 1 mM или по-ниска въз основа на границата на разтворимост), в присъствието на забелязана мътност или преципитация. Концентрациите във втория и третия експеримент следва да се коригират, както е подходящо, за да характеризират по-добре кривата отклик-концентрация.

Критерии за приемливост на изпитвателната серия

20. Приемането или отхвърлянето на изпитвателна серия се прави на базата на оценката на резултатите, получени за референтния естроген и контролата, използвани за всеки експеримент. На първо място, за плака 1 пълните криви на концентрация за референтните контроли от всеки експеримент следва да съответстват на измерванията на ефективността с параметрите на налагане на кривата (напр. IC_{50} и наклон на Хил) въз основа на резултатите, докладвани за съответните протоколи за изследванията на CER1 и на FW (допълнения 2 и 3), както и на данните за контроли от предходни периоди от лабораторията, провеждаща изпитването. Всички контроли (референтен естроген, слабо свързващо вещество и несвързващо вещество) следва да се класифицират правилно за всеки експеримент. На второ място, контролите на всички последващи плаки трябва да се оценят за последователност с плака 1. Следва да се използва достатъчен диапазон на концентрации на изпитвания химикал за ясно определяне на горната част на кривата на конкурентно свързване. Вариабилността между повторенията при всяка концентрация на изпитвания химикал, както и между трите независими серии следва да е разумна и обоснована от научна гледна точка. Способността за последователно изпълнение на изследването следва да бъде доказана чрез разработката и поддържането на база данни от предходни периоди относно референтния естроген и контроли. Стандартните отклонения (SD) или коефициентите на вариация (CV) за параметрите за налагане на кривите на средните стойности за референтния естроген и контролните слаби свързващи вещества от множество експерименти могат да бъдат използвани като мярка за вътрешнолабораторната възпроизводимост. Следва да се приложи професионална преценка, когато се преглеждат резултатите от контролите на плаката от всяка серия, както и за всеки изпитван химикал.

Допълнително следва да бъдат изпълнени следните принципи относно критериите за приемливост:

- данните следва да са достатъчно, за да се направи количествена оценка на свързването към ER;
- изпитваните концентрации следва да останат в рамките на диапазона на разтворимост на изпитвания химикал.

Анализ на данните

21. Определената процедура за анализ на данните за свързването до насищане и конкурентно свързване следва да спазва основните принципи за характеризиране на взаимодействията рецептор-лиганд. Обикновено данните за свързването до насищане се анализират чрез модел на нелинейна регресия, който отчита общото и неспецифичното свързване. Може да се наложи корекция за изчерпване на лиганда (например Swillens, 1995 г. (19)), когато се определят V_{max} и K_d . Данните от изследванията за конкурентно свързване обикновено се преобразуват (например процент на специфично свързване и концентрация на изпитвания химикал ($\log M$)). Изчислените логаритмични стойности (IC_{50}) за всеки изпитван химикал следва да се определят чрез подходящ софтуер за нелинейно налагане на крива с цел налагане на уравнение на Хил с четири параметъра. След първоначален анализ следва да се направи преглед на параметрите на налагане на кривата и да се направи визуален преглед доколко добре данните за свързването съвпадат с генерираната крива на конкурентно свързване. В някои случаи може да се наложи допълнителен анализ, за да се получи най-доброто налагане на кривата (напр. ограничаване на най-високата и/или най-ниската част на кривата, използване на правилото за 10%, вж. допълнение 4 и справка 2 (раздел III.A.2)).
22. Изпълнението на критериите за приемливост (точка 20) показва, че системата на изследването работи правилно, но не гарантира, че конкретно изпитване ще даде точни данни. Повторението на правилните резултати от първото изпитване е най-доброто указание, че се получават точни данни.

Общи критерии за тълкуване на данните

23. Понастоящем не съществува универсално съгласуван метод за тълкуване на данните за свързване към ER. Въпреки това и качествените (напр. свързващо/несвързващо вещество), и/или количествените (напр. $\log IC_{50}$, относителен афинитет за свързване (RBA) и т.н.) оценки на опосредстваната от hER активност следва да бъдат базирани на емпирични данни и разумна научна преценка.

Протокол от изпитването

24. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изследване:

- използвано изследване;

Контрола/референтно вещество/изпитван химикал

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или по CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител/носител:

- характеристики (естество, доставчик и партида);
- обосновка за избора на разтворител/носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;

Рецептори:

- източник на рецепторите (доставчик, каталожен номер, партида, вид на рецептора, концентрация на активния рецептор, предоставена от доставчика, сертифициране от доставчика);
- характеризирание на рецепторите (в това число резултатите от свързването до насищане): K_d , B_{max} ;
- съхранение на рецепторите;
- радиомаркиран лиганд;
- доставчик, каталожен номер, партида, специфична активност.

Условия на изпитването:

- ограничения на разтворимостта при условията на изследването;
- състав на свързващия буфер;
- концентрация на рецептора;
- концентрация на маркера (т.е. радиомаркирания лиганд);
- концентрации на изпитвания химикал;
- процент носител в окончателното изследване;
- температура и време на инкубация;
- метод на разделяне на свързано от свободно вещество;
- положителни и отрицателни контроли/референтни вещества;
- критерии за считане на изпитванията за положителни, отрицателни или нееднозначни.

Проверка за приемливост:

- действителни стойности на IC_{50} и наклона на Хил за паралелни положителни контроли/референтни вещества.

Резултати:

- сурови данни и данни за свързано вещество/свободно вещество;
- проверка за потвърждение на денатуриране, ако е подходящо;
- ако съществува, най-ниската ефективна концентрация (LEC);
- стойностите на RBA и/или IC_{50} по целесъобразност;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- статистически анализи, ако има такива, заедно с мярката за грешка и достоверност (напр. SEM, SD, CV или 95% доверителен интервал) и описание на начина за получаване на тези стойности.

Обсъждане на резултатите:

- прилагане на правилото за 10%.

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

(7)

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СЪКРАЩЕНИЯ

Правилото за 10%: възможност за изключване от анализите на точки с данни, където средната стойност на повторенията за процента на специфично свързан [³H]17β-естрадиол е 10% или повече над наблюдавания за средната стойност при по-ниска концентрация (вж. допълнение 4).

Критерии за приемливост: минималните стандарти за ефективност на експерименталните контроли и референтните еталони. Всички критерии за приемливост следва да бъдат изпълнени, за да може даден експеримент да се разглежда като валиден.

Точност (съответствие): степента на близост между резултатите от изследването и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на изследването и един от аспектите на неговата относимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при дадено изследване (1).

СФ: Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценяване на вещества, нарушаващи функцията на ендокринната система.

Химикал: Вещество или смес.

CV: Коефициент на вариация

E2: 17β-естрадиол

ЕН: ендокринно нарушение

hERα: Човешки естрогенен рецептор алфа

ER: Естрогенен рецептор

Естрогенна активност: способността на химикал да имитира 17β-естрадиол в способността си да се свързва с естрогенни рецептори. С този метод на изпитване може да се открие свързване към hERα.

IC₅₀: половината от максимално ефективната предизвикваща потискане концентрация на изпитван химикал.

ICCVAM: междуправителен координационен комитет за валидиране на алтернативни методи.

Междулабораторна възпроизводимост: мярка за степента, в която различните квалифицирани лаборатории могат да получат качествено и количествено сходни резултати, като използват един и същ протокол и изпитват едни и същи вещества. Междулабораторната възпроизводимост се определя по време на предвалидационните и валидационните процедури и указва степента, в която дадено изследване може успешно да бъде прехвърлено между различни лаборатории, наричана също интерлабораторна

възпроизводимост (1).

Вътрешнолабораторна възпроизводимост: определяне на степента, в която квалифицирани служители в рамките на една и съща лаборатория могат да възпроизведат успешно резултатите, като използват конкретен протокол в различни моменти. Нарича се също „интралабораторна възпроизводимост“ (1).

ЛЕС: най-ниската ефективна концентрация е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, която предизвиква отклик (*т.е.* най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която кратността на индукция е статистически различна от паралелната контрола на носителя).

Вариантен метод за изпитване (me-too test): Разговорен израз за изследване, който е структурно и функционално сходен с валидиран и приет референтен метод за изпитване. Използва се взаимозаменяемо със „сходен метод на изпитване“.

PBTG: Насоки за изпитване, базирани на ефективност

Стандарти за ефективност: стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложено изследване, което от гледна точка на своя механизъм и от функционална гледна точка е сходно с валидирания метод. Включени са (1) съществени компоненти на изследването; (2) минимален списък на референтни химикали, подбрани измежду химикалите, използвани за демонстриране на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и (3) сравнимите нива за точност и надеждност въз основа на получените нива за валидирания метод на изпитване, които предложеното изследване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (1).

Вещества за изследване за пригодност: подмножество от референтни вещества, включени в Стандартите за ефективност, които може да се използват от лабораториите за доказване на техническа пригодност по отношение на стандартизирано изследване. Критериите за подбор на тези вещества обикновено включват изискването те да представляват обхвата от отговори, да се предлагат в търговската мрежа и да имат налични висококачествени референтни данни.

Пригодност: Доказаната способност за правилно провеждане на изследване преди изпитване на неизвестни вещества.

Референтен естроген: 17 β -естрадиол (E2, CAS 50-28-2).

Референтни методи на изпитване: Изследванията, на които е базиран PBTG 493.

RBA: относителен афинитет за свързване. RBA на дадено вещество се изчислява като процент от логаритмичната стойност (IC₅₀) за веществото спрямо логаритмичната стойност (IC₅₀) за 17 β -естрадиол.

Относителност: описание на взаимовръзката между изследването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изследването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Приложимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на

изследването (1).

Надеждност: мярка за степента, в която дадено изследване може да се проведе възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории с течение на времето, при използване на един и същ протокол. Определя се, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост.

SD: Стандартно отклонение.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Валидиран метод за изпитване: изследване, за което са извършени изследването за валидиране за определяне на приложимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод на изпитване може да не притежава достатъчно ефективност по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приемлив за предлаганата цел (1).

Валидиране: Процесът, чрез който надеждността и относимостта на конкретен подход, метод, изследване, процес или оценка се установяват за определена цел (1).

Допълнение 2

ИЗСЛЕДВАНИЯ *IN VITRO* НА FREYBERGER-WILSON ЗА СВЪРЗВАНЕ ДО НАСИЩАНЕ И КОНКУРЕНТНО СВЪРЗВАНЕ КЪМ ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР (ER α) С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЦЯЛОСТЕН РЕКОМБИНАНТЕН ER α

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

1. В това изследване *in vitro* за свързване до насищане и конкурентно свързване към естрогенен рецептор (ER α) се използва цялостен човешки рецептор ER α (hrER α), който е произведен в и изолиран от заразени с baculovirus клетки на насекоми. Протоколът на CERI е преминал през международно многолабораторно изследване за валидиране (2), което е доказало неговата относимост и надеждност за целта на изследването.
2. Това изследване представлява скринингова процедура за идентифициране на вещества, които могат да се свързват с hrER α . То се използва за определяне на способността на даден изпитван химикал да се конкурира със 17 β -естрадиол за свързване с hrER α -LBD. Количествените резултати на изследването могат да включват IC₅₀ (мярка за концентрацията на изпитван химикал, необходима за изместване на половината от [³H]-17 β -естрадиол от hrER α) и относителните афинитети на свързване на изпитвани химикали за hrER α в сравнение със 17 β -естрадиол. За целите на химичен скрининг приемливите качествени резултати на изследването могат да включват класификации на изпитвани химикали като свързващи hrER α , не свързващи или нееднозначни въз основа на критериите, описани за кривите на свързване.
3. Изследването използва радиоактивен лиганд, който изисква лабораторията да притежава лиценз за радиоактивни материали. Всички процедури с радиоизотопи и опасни химикали следва да спазват разпоредбите и процедурите, както са описани от националното законодателство.
4. Разделите „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“ и „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО СВЪРЗВАНЕ НА ” hrER“ следва да бъдат прочетени, преди да се използва настоящото изследване за регулаторни цели. Използваните в настоящите TG определения и съкращения са описани в Допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

5. Изследването за свързване с hrER α измерва способността на радиомаркиран лиганд ([³H]17 β -естрадиол) да се свързва с ER в присъствието на нарастващи концентрации на изпитван химикал (т.е. конкурент). Изпитваните химикали, които имат висок

афинитет към ER, се конкурират с радиомаркирания лиганд при по-ниска концентрация в сравнение с химикалите с по-нисък афинитет към рецептора.

6. Това изследване се състои от два основни компонента: експеримент за свързване до насищане с цел характеризиране на параметрите на взаимодействието рецептор – лиганд, последван от експеримент за конкурентно свързване, който характеризира конкуренцията между изпитван химикал и радиомаркиран лиганд за свързване към ER.
7. Целта на експеримента за свързване до насищане е да характеризира специална партида рецептори за афинитет на свързване и брой при подготовка за експеримента на конкурентно свързване. Експериментът за свързване до насищане измерва, при равновесни условия, афинитета на фиксирана концентрация на естрогенния рецептор за неговия естествен лиганд (представен от дисоциационна константа, K_d) и концентрацията на активните места на рецептора (B_{max}).
8. Експериментът за свързване до насищане измерва афинитета на дадено вещество да се конкурира с $[3H]17\beta$ -естрадиол за свързване с ER. Афинитетът се определя количествено от концентрацията на изпитван химикал, която, при равновесие, инхибира 50% от специфичното свързване на $[3H]17\beta$ -естрадиол (наричана „инхибиторна концентрация 50%“ или IC_{50}). Това може да се оцени и с използване на относителния афинитет на свързване (RBA, по отношение на IC_{50} на естрадиол, измерен отделно в същата серия). Експериментът за конкурентно свързване измерва свързването на $[3H]17\beta$ -естрадиол при фиксирана концентрация в присъствието на широк диапазон (осем порядъка) на концентрации на изпитван химикал. След това данните се вписват, където е възможно, във форма на уравнение на Хил (Хил, 1910), което описва изместването на радиолиганда от конкурентно свързващо вещество на едно място. Степента на изместване на радиомаркирания естрадиол при равновесие се използва за характеризиране на изпитвания химикал като свързващ, несвързващ или предизвикващ нееднозначен отклик.

ПРОЦЕДУРА

Демонстриране на приемлива ефективност на hrER α протеин

9. Преди рутинно провеждане на изследвания за насищане и конкурентно свързване, всяка нова партида hrER α следва да демонстрира правилно функциониране в лабораторията, в която ще се използва. За демонстриране на ефективност следва да се използва двустъпков процес. Тези стъпки са следните:
 - Проведете изследване за насищане и свързване на $[3H]$ - 17β -естрадиол, за да се демонстрира специфичност и насищане на hrER α . Анализът на нелинейна регресия на тези данни (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995) и последващата диаграма на Scatchard следва да документират афинитета на свързване с hrER α на

[3H]-17 β -естрадиол (K_d) и броя на рецепторите (B_{max}) за определена партида на hrER α .

- Проведете изследване за конкурентно свързване с използване на контролните вещества (референтен естроген (17 β -естрадиол), слабо свързващо вещество (напр. норетинодрел или норетиндрон) и несвързващо вещество (октилтриетоксисилан, OTES). Всяка лаборатория следва да определи база данни от предходни периоди за документиране на последователността на IC50 и съответните стойности за референтния естроген и слабо свързващо вещество измежду експериментите и различните партиди на hrER α . Освен това параметрите на кривите на конкурентно свързване за контролните вещества следва да са в границите на 95%-я доверителен интервал (вж. Таблица 1), които са разработени с използване на данни от лаборатории, които са участвали във изследване за валидиране на това изследване (2).

Таблица 1: Критерии за ефективност, разработени за референтния естроген и слабо свързващо вещество, изследване за свързване към hrER на FW.

Вещество	Параметър	Средна стойност ^a	Стандартно отклонение (n)	95% доверителни интервали ^b	
				Долна граница	Горна граница
17β-естрадиол	Най-високо (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Най-ниско (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Наклон на Хил	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^b	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Норетинодрел	Най-високо (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Най-ниско (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Наклон на Хил	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Норетиндрон ^b	Най-високо (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Най-ниско (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Наклон на Хил	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^aСредните стойности (n) ± стандартно отклонение (SD) са изчислени с използване на оценки на параметрите на налагането на кривата (уравнение на Хил с 4 параметъра) за контролни серии, проведени в четири лаборатории по време на изследването за валидиране (вж. приложение N към справка 2).

^b 95% доверителни интервали се предоставят като насока за критериите за приемливост.

^c Изпитването на норетиндрон не е задължително за подзадача 4 по време на изследването за валидиране (вж. справка 2, вж. подзадача 4). Следователно средните стойности ± CO (n) са изчислени с използване на оценки на налагането на кривата (уравнение на Хил с 4 параметъра) за контролни серии, проведени в две лаборатории.

Диапазонът за IC₅₀ зависи от Kd на рецепторния препарат и концентрацията на радиомаркирания лиганд, използван във всяка лаборатория. Приемлива е подходяща корекция за диапазона на IC₅₀ въз основа на условията, използвани за провеждане на изследването.

Доказване на пригодността на лабораторията

- Вж. точки 17 и 18 и таблица 2 в „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА СВЪРЗВАНЕ КЪМ hrER“ от настоящия метод на изпитване. Всяко изследване (на насищане и конкурентно свързване) следва да се състои от три независими серии (т.е. с пресни разредени разтвори на рецептор, химикали и реактиви) в различни дни и всяка серия следва да съдържа три повторения.

Определяне на концентрацията на рецептора (hrERα)

- Концентрацията на активния рецептор леко варира според партидата и условията на съхранение. Поради тази причина концентрацията на активния рецептор следва да се определи така, както е получена от доставчика. Това ще доведе до подходящата концентрация на активния рецептор към момента на провеждане на серията.

12. При условия, отговарящи на конкурентно свързване (т.е. 1 nM [^3H]-естрадиол), номинални концентрации на рецептор от 0,25, 0,5, 0,75 и 1 nM следва да се инкубират в отсъствието (общо свързване) и присъствието (неспецифично свързване) на 1 μM немаркиран естрадиол. Специфичното свързване, изчислено като разликата между общото и неспецифичното свързване, се изчертава като зависимост спрямо номиналната концентрация на рецептора. Концентрацията на рецептор, която дава стойности на специфично свързване, съответстващи на 20% от добавения радиомаркер, е свързана със съответната концентрация на рецептора и тази концентрация на рецептора следва да се използва в опитите за насищане и конкурентно свързване. Често на това условие отговаря окончателна концентрация на hrER от 0,5 nM.
13. Ако критерият за 20% не може да бъде удовлетворен, следва да се провери настройката на експеримента за възможни грешки. Невъзможността за постигане на критерия за 20% може да сочи, че в рекомбинантната партида има много малко количество активен рецептор и тогава следва да се обмисли използването на друга партида рецептор.

Изследване на насищане

14. Следва да се оценят три пъти осем увеличаващи се концентрации на [^3H]-17 β -естрадиол при спазване на следните три условия (вж. Таблица 2):
- В отсъствието на немаркиран 17 β -естрадиол и присъствието на ER. Това е определянето на тоталното свързване чрез измерване на радиоактивността в ямките, в които има само [^3H]-17 β -естрадиол.
 - В присъствието на 1000 пъти по-голяма концентрация на немаркиран 17 β -естрадиол спрямо маркиран 17 β -естрадиол и присъствието на ER. Целта на това условие да се наситят местата на активно свързване с немаркиран 17 β -естрадиол и чрез измерване на радиоактивността в тези ямки да се определи неспецифичното свързване. Всяко оставащо количество горещ естрадиол, който може да се свърже с рецептора, се счита за свързан в неспецифично място, тъй като студеният естрадиол следва да е с такава висока концентрация, при която той се свързва с всички налични специфични места на рецептора.
 - В отсъствието на немаркиран 17 β -естрадиол и отсъствието на ER (определяне на обща радиоактивност)

Приготвяне на [^3H]-17 β -естрадиол, разтвори на немаркиран 17 β -естрадиол и hrERa

15. Разрежданията на [^3H]-17 β -естрадиол следва да се приготвят чрез добавяне на буфер, използван за изследването, към 12 nM изходен разтвор на [^3H]-17 β -естрадиол за получаване на концентрации, които първоначално варират от 0,12 nM до 12 nM. Чрез добавяне на 40 μl от тези разтвори към съответните ямки за изследване на 96-ямкова микротитърна плака (при краен обем 160 μl) ще се получат крайните концентрации за

изследването в диапазона от 0,03 до 3,0 nM. Приготвянето на буфера, използван в изследването, изходния разтвор на [³H]-17β-естрадиол и разрежданията, както и определянето на концентрациите са описани подробно в протокола за изследването на FW (2).

16. Разредените разтвори на немаркиран 17β-естрадиол следва да се приготвят от 0.06 nM изходен разтвор на 17β-естрадиол чрез добавяне на буфер, използван в изследването, за да се постигнат осем увеличаващи се концентрации, които първоначално варират от 6 μM до 80 μM. Окончателните концентрации на изследването, вариращи от 80 до 96 nM, се получават чрез добавяне на 160 μl от тези разтвори към съответните ямки на 0-ямкова микротитърна плака (вж. Таблици 2 и 3). Крайната концентрация на немаркирания 17β-естрадиол в отделните ямки за изследване на неспецифичното свързване следва да е 1000 пъти по-висока от концентрацията на маркирания [³H]-17β-естрадиол. Приготвянето на разредени разтвори на немаркиран 17β-естрадиол е описано подробно в протокола на CERI (2).
17. Следва да се използва това количество на рецептор, което дава специфично свързване от 20±5% (вж. точки 12-13 на Допълнение 3). Разтворът на hrERα следва да се приготви непосредствено преди употреба.
18. 96-ямковите микротитърни плаки се приготвят както е показано в Таблица 2, с 3 повторения за всяка концентрация. Примери за определяне на концентрацията на плаката и обема на [³H]-17β-естрадиол, немаркиран 17β-естрадиол, буфера и рецептора са дадени в допълнение 2.2.

Таблица 2: Схема на микротитърна плака за изследване за свързване до насищане

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + EP			0,06 nM [³ H] E ₂ + EP			0,08 nM [³ H] E ₂ + EP			0,10 nM [³ H] E ₂ + EP			Общо свързване (разтвори тел)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + EP			0,60 nM [³ H] E ₂ + EP			1,0 nM [³ H] E ₂ + EP			3,0 nM [³ H] E ₂ + EP			
<i>B</i>													
<i>Г</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,10 μM E ₂			Неспецифично свързване
<i>Д</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + EP + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + EP + 3,0 μM E ₂			
<i>E</i>													
<i>Ж</i>													
<i>З</i>													

[³H] E₂: [³H]-17β-естрадиол

ER: естрогенен рецептор

E₂: немаркиран 17β-естрадиол

19. Микротитърните плаки за изследването следва да се инкубират при температура от 2° до 8°C в продължение на 16 до 20 часа и да се поставят в ротатор по време на инкубационния период.

Измерване на [3H]-17β-естрадиол, свързан с hrERα

20. Свързаният с hrERα [3H]-17β-естрадиол следва да се отдели от свободния [3H]-17β-естрадиол чрез добавяне на 80 µl охладена суспензия на DCC във всяка ямка, разклащане на микротитърните плаки в продължение на 10 минути и центрофугиране в продължение на 10 минути при около 2500 оборота в минута. За да се сведе до минимум разделянето на свързания с hrERα [3H]-17β-естрадиол по време на този процес, е изключително важно буферите и ямките за изследване да се държат при температура от 2 до 8°C и всяка стъпка да се провежда бързо. За ефективно и бързо обработване на плаките е необходима разклащаща машина за микротитърни плаки.
21. 50 µl от супернатанта, съдържащ свързан с hrERα [3H]-17β-естрадиол, след това следва да се отдели изключително внимателно, за да се избегне всяко замърсяване на ямките от контакт с DCC, и трябва да се използва за сцинтилационно броене.
22. След това във всяка ямка (A1—B12 и D1—E12) следва да се добавят 200 µl от сцинтилационната течност, която е способна да преобразува кинетичната енергия на ядрените излъчвания в светлинна енергия. Ямки G1—H12 (идентифицирани като обща стойност на dpms) представляват последователни разреждания на [3H]-17β-естрадиол (40 µl), които следва да се доставят директно в сцинтилационната течност в ямките на измервателната плака, както е посочено в таблица 3, т.е. тези ямки съдържат само 200 µl сцинтилационна течност и подходящия разреден разтвор на [3H]-17β-естрадиол. Тези измервания демонстрират колко [3H]-17β-естрадиол в dpms е добавен към всеки набор от ямки за общото свързване и неспецифичното свързване.

Таблица 3: Схема на микротитърна плака за изследване за свързване до насищане, измерване на радиоактивността

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + EP			0,06 nM [³ H] E ₂ + EP			0,08 nM [³ H] E ₂ + EP			0,10 nM [³ H] E ₂ + EP			Общо свързване (разтворител)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + EP			0,60 nM [³ H] E ₂ + EP			1,0 nM [³ H] E ₂ + EP			3,0 nM [³ H] E ₂ + EP			
<i>B</i>													
<i>Г</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,10 μM E ₂			Неспецифично свързване
<i>Д</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + EP + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + EP + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + EP + 3,0 μM E ₂			
<i>E</i>													
<i>Ж</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ (общо dpms)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Общо dpms*

3	0,30 nM [³ H] E ₂	0,60 nM [³ H] E ₂	1,0 nM [³ H] E ₂	3,0 nM [³ H] E ₂	

[³H] E₂: [³H]-17β-естрадиол

ER: естрогенен рецептор

E₂: немаркиран 17β-естрадиол

dpms: разпадане в минута

*Горещите последователни разреждания на [³H]-маркиран естрадиол тук следва да се добавят директно към 200 μl сцинтилационна течност в ямки G1—H12.

23. Измерването следва да започне с отстъп от най-малко 2 часа, а времето за преброяване следва да е 40 минути на ямка. За определянето на dpm/ямка с корекция на потискането следва да се използва сцинтилационен брояч за микротитърни плаки. Ако сцинтилационен брояч за микротитърни плаки не е на разположение, другата възможност е пробите да се измерват в конвенционален брояч. При тези условия може да се обмисли намаляване на времето за преброяване.

Изследване на конкурентно свързване

24. Изследването за конкурентно свързване измерва свързването на една концентрация на [³H]-17β-естрадиол в присъствието на увеличаващи се концентрации на изпитван химикал. За всяка концентрация в рамките на една серия следва да се използват три паралелни повторения. Освен това следва да се проведат три непаралелни серии за всеки изпитван химикал. Изследването трябва да се проведе в една или повече 96-ямкови микротитърни плаки.

Контроли

25. При провеждане на изследването във всеки експеримент следва да се включват паралелни разтворител и контроли (т.е. референтен естроген, слабо свързващо вещество и несвързващо вещество). Пълните криви на концентрация за референтния естроген и контролите (т.е. слабо свързващо вещество и несвързващо вещество) следва да се използват в една плака по време на всяка серия. Всички останали плаки следва да съдържат i) висока (максимално изместване) и средна (приблизително IC₅₀) концентрация на E₂ и слабо свързващо вещество в по три повторения; (ii) контрола на разтворителя и неспецифичното свързване, всяка в три повторения. Процедурите за приготвяне на използвания в изследването буфер, [³H]-17β-естрадиол, hrERα и разтворите на изпитван химикал са описани подробно в протокола на CER1 (2).

Контрол на разтворител:

26. Контролата на разтворителя показва, че разтворителят не взаимодейства с изпитваната система и измерва също така общото свързване (ТВ). Предпочитаният разтворител е DMSO. Като алтернатива, ако най-високата концентрация на изпитвания химикал не е разтворима в DMSO, може да се използва етанол.

Концентрацията на етанол или DMSO, ако се използва, в ямките на крайното изследване е 1,5% и не може да надвишава 2%.

Контрол на буфер:

27. Контролата на буфера (BC) не трябва да съдържа нито разтворител, нито изпитван химикал, но трябва да включва всички други компоненти на изследването. Резултатите на контролата на буфера се сравняват с контролата на разтворителя, за да провери, че използваният разтворител не влияе върху системата на изследването.

Силно свързващо вещество (референтен естроген)

28. 17 β -естрадиол (CAS № 50-28-2) е ендогенен лиганд и се свързва с висок афинитет с ER, подтип алфа. За всяко изследване на конкурентно свързване на hrER α следва да се приготви стандартна крива с използване на 17 β -естрадиол, за да се позволи оценка на променливостта при провеждане на изследването във времето в рамките на една и съща лаборатория. Следва да се приготвят осем разтвора на немаркиран 17 β -естрадиол в етанол, като концентрациите в ямките за изследване следва да варират в диапазона от 100 nM до 10 pM (-7[logM] до -11[logM]), разпределени, както следва: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Най-високата концентрация на немаркиран 17 β -естрадиол (1 μ M) следва да служи като индикатор за неспецифично свързване. Тази концентрация се разграничава чрез етикета „NSB“ в Таблица 4, въпреки че също е част от стандартната крива.

Слабо свързващо вещество

29. Следва да се включи слабо свързващо вещество (норетинодрел (CAS № 68-23-5) или, като алтернатива, норетиндрон (CAS № 68-22-4)), за да докаже чувствителността на всеки експеримент и да се позволи оценка на променливостта при провеждане на изследването във времето. Следва да се приготвят осем разтвора на слабото свързващо вещество в етанол, като концентрациите в ямките за изследване варират от 3 nM до 30 μ M (-8,5[logM] до -4,5[logM]), разпределени, както следва: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Несвързващо вещество

30. Като отрицателна контрола (несвързващо вещество) следва да се използва октитриетоксисилан (OTES, CAS № 2943-75-1). Той гарантира, че изследването, както се провежда, открива изпитвани химикали, които не се свързват с hrER α . Следва да се приготвят осем разтвора на несвързващото вещество в етанол, като концентрациите в ямките за изследване следва да варират в диапазона от 0,1nM до 1000 μ M (-10[logM] до -3[logM]) с логаритмична стъпка. Ди-*n*-бутил фталат (ДБФ) може да се използва като алтернативно контролно несвързващо вещество. Налице са данни, че максималната му разтворимост е -4[logM].

Концентрация на hrER α

31. Следва да се използва това количество на рецептор, което дава специфично свързване от $20 \pm 5\%$ на 1 nM радиолиганд (вж. точки 12—13 на Допълнение 2). Разтворът на hrER α следва да се приготви непосредствено преди употреба.

[³H]-17 β -естрадиол

32. Окончателната концентрация на [³H]-17 β -естрадиол в анализираните ямки следва да е 1,0 nM.

Изпитвани химикали

33. На първо място е необходимо да се проведе тест за разтворимост, за да се определи границата на разтворимост за всеки изпитван химикал и да се идентифицира подходящия диапазон на концентрация за използване при изпълнение на протокола на изпитването. Границата на разтворимост на всеки изпитван химикал трябва първо да се определи в разтворителя и допълнително да се потвърди при условията на изследването. Крайната концентрация, изпитвана в изследването, не трябва да надвишава 1 mM. Изпитването за установяване на диапазона включва контрола на разтворител заедно с осем логаритмични последователни разреждания, започвайки с максималната приемлива концентрация (напр. 8 mM или по-ниска въз основа на границата на разтворимост), в присъствието на забелязана мътност или преципитация. Изпитваният химикал следва да се изпита, като се използват 8 криви на концентрации с логаритмична стъпка между тях, определени от предшестващото изпитване за установяване на диапазона. Концентрациите във втория и третия експеримент следва да се коригират, както е подходящо, за да характеризират по-добре кривата отклик-концентрация.
34. Разрежданията на изпитвания химикал следва да се приготвят в подходящия разтворител (вж. точка 26 на Допълнение 2). Ако най-високата концентрация на изпитвания химикал не е разтворима в DMSO или етанол и добавянето на още разтворител би довело до това концентрацията на разтворителя в окончателната епруветка да е по-голяма от приемливата граница, най-високата концентрация може да бъде намалена до следващата по-ниска концентрация. В този случай може да се добави допълнителна концентрация в долната част на серията от концентрации. Другите концентрации в сериите следва да останат без промяна.
35. Разтворите на изпитвания химикал следва да се наблюдават отблизо, когато се добавят в ямката, тъй като изпитваният химикал може да се утаи при добавянето му в ямката. Данните за всички ямки, съдържащи преципитат, следва да се изключат от налагането на кривата и да се отбележат причините за изключването на данните.
36. Ако съществува предходна информация от други източници, която предоставя логаритъм (IC₅₀) на даден изпитван химикал, може да е подходящо разрежданията да се разпределят геометрично по-близо около очаквания логаритъм (IC₅₀) (т.е. 0,5 логаритмични единици). Окончателните резултати следва да демонстрират

достатъчно разпределение на концентрациите от всяка страна на логаритъма (IC₅₀), включително „горе“ и „долу“, така че кривата на свързването да може да бъде адекватно характеризирана.

Организация на изследваната плака

37. Маркираните микротитърни плаки следва да се приготвят с използване на шестократни инкубации за контролата на разтворителя, най-високата концентрация на референтния естроген (E2), която служи и като индикатор за неспецифично свързване (NSB), контролата на буфера, осемте концентрации на контролата за несвързващо вещество (октилтриетоксисилан), седемте по-ниски концентрации на референтния естроген (E2), осемте концентрации на слабо свързващото вещество (норетинодрел или норетинодрон) и осемте концентрации на всеки изпитван химикал (ТС). Примерна схема на диаграмата на плаката за кривите на пълна концентрация за референтния естроген и контролите е дадена по-долу в Таблица 4. Допълнителни микротитърни плаки се използват за изпитвания химикал и следва да съдържат контроли на плаката (т.е. 1) висока (максимално изместване) и средна (приблизително IC₅₀) концентрация на E2 и слабо свързващото вещество в три повторения; 2) контрола на разтворителя и неспецифично свързване в по шест повторения (Таблица 5). Пример за схема на микротитърна плака за работна таблица на конкурентно изследване е предоставен в Допълнение 2.3. Посочените в таблици 4 и 5 концентрации са крайните концентрации на изследването. Максималната концентрация за E2 следва да е 1×10^{-7} M, а за слабо свързващото вещество следва да се използва най-високата концентрация, използвана за слабото свързващо вещество в плака 1. Концентрацията IC₅₀ следва да се определи от лабораторията въз основа на нейната база данни за контроли от предходни периоди. Очакването е, че тази стойност ще е сходна с наблюдаваната във изследванията за валидиране (вж. Таблица 1).

Таблица 4: Схема на микротитърна плака за изследване на конкурентно свързване, пълни криви на концентрация за референтен естроген и контроли (плака 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТВ (само разтворител)			ТВ (само разтворител)			NSB			NSB		
Б	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
В	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Празна *		
Г	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
Д	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
Е	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
Ж	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
З	Празна (за горещ)**			Празна (за горещ)**			Контрола на буфер			Контрола на буфер		

В този пример слабото свързващо вещество е норетинодрел (NE)

* наистина празна, ямката не е използвана

** празна, неизползвана по време на инкубацията, но използвана за потвърждаване на общата добавена радиоактивност.

Таблица 5: Схема на микротитърна плака за изследването на конкурентно свързване, пълни криви на концентрацията за изпитваните химикали и контролите на плаката.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТВ (само разтворител)			ТВ (само разтворител)			NSB			NSB		
Б	TC1 (1×10 ⁻³)			TC1 (1×10 ⁻⁴)			TC1 (1×10 ⁻⁵)			TC1 (1×10 ⁻⁶)		
В	TC1 (1×10 ⁻⁷)			TC1 (1×10 ⁻⁸)			TC1 (1×10 ⁻⁹)			TC1 (1×10 ⁻¹⁰)		
Г	TC2 (1×10 ⁻³)			TC2 (1×10 ⁻⁴)			TC2 (1×10 ⁻⁵)			TC2 (1×10 ⁻⁶)		
Д	TC2 (1×10 ⁻⁷)			TC2 (1×10 ⁻⁸)			TC2 (1×10 ⁻⁹)			TC2 (1×10 ⁻¹⁰)		
Е	TC3 (1×10 ⁻³)			TC3 (1×10 ⁻⁴)			TC3 (1×10 ⁻⁵)			TC3 (1×10 ⁻⁶)		
Ж	TC3 (1×10 ⁻⁷)			TC3 (1×10 ⁻⁸)			TC3 (1×10 ⁻⁹)			TC3 (1×10 ⁻¹⁰)		
З	NE (IC ₅₀)			NE (1×10 ^{-4,5})			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10 ⁻⁷)		

В този пример слабото свързващо вещество е норетинодрел (NE)

Завършване на изследване на конкурентно свързване

38. Както е показано в таблица 6, в ямките следва да се добавят 80 µl контрола на разтворителя, контрола на буфера, референтен естроген, слабо свързващо вещество, несвързващо вещество и изпитвани химикали, подготвени в буфер, предназначен за изследването. След това във всяка ямка следва да се добавят 40 µl от 4 nM разтвор на [3H]-17β-естрадиол. След леко завъртане в продължение на 10 до 15 минути при температура от 2° до 8°C, следва да се добавят 40 µl от разтвора на hrERα. Микротитърните плаки за изследването следва да се инкубират при температура от 2° до 8°C в продължение на 16 до 20 часа и да се поставят в ротатор по време на инкубационния период.

Таблица 6: Обем на компонентите на изследването на конкурентно свързване към hrER, микротитърни плаки

Обем (µl)	Съставка
80	Немаркиран 17β-естрадиол, норетинодрел, OTES, изпитвани химикали, разтворител или буфер
40	4 nM разтвор на [3H]-17β-естрадиол
40	разтвор на hrERα, концентрация според определеното
160	Общ обем във всяка ямка на изследването

39. Количественото определяне на [^3H]-17 β -естрадиол, свързан с hrER α , след отделяне на [^3H]-17 β -естрадиол, свързан с hrER α , от свободен [^3H]-17 β -естрадиол чрез добавяне на 80 μl охладена суспензия на DCC във всяка ямка, следва да се извърши след това, както е описано в точки 20—23 за изследването на свързване до насищане.
40. Ямки H1—6 (идентифицирани като празни (за горещо състояние) в таблица 4) представляват dpm на [^3H]-маркиран естрадиол в 40 μl . 40 μl аликвотна част следва да се достави директно в сцинтилационната течност в ямки H1—H6.

Критерии за приемливост

Изследване на свързване до насищане

41. Кривата на специфично свързване следва да достигне връх при използването на все по-големи концентрации на [^3H]-17 β -естрадиол, което показва насищане на hrER α с лиганд.
42. Специфичното свързване при 1 nM от [^3H]-17 β -естрадиол следва да е в рамките на приемливия диапазон от 15% до 25% от средната измерена обща радиоактивност, добавена в сериите. Случайни леки отклонения извън този диапазон са допустими, но ако сериите последователно са извън този диапазон или дадена серия излиза значително извън този диапазон, концентрацията на протеин следва да се коригира и изследването за насищане да се повтори.
43. Данните следва да произведат линейна диаграма на Scatchard.
44. Неспецифичното свързване не трябва да е прекомерно. Стойността на неспецифичното свързване следва обикновено да е <35% от общото свързване. Въпреки това съотношението може от време на време да надвишава тази граница, когато се измерва много ниска стойност на dpm за най-ниската изпитвана концентрация на радиомаркиран 17 β -естрадиол.

Изследване на конкурентно свързване

45. Увеличаващите се концентрации на немаркиран 17 β -естрадиол следва да изместят [^3H]-17 β -естрадиол от рецептора по начин, съответстващ на конкурентно свързване в едно място.
46. Стойността на IC₅₀ за референтния естроген (т.е. 17 β -естрадиол) следва да е приблизително равна на моларната концентрация на [^3H]-17 β -естрадиол плюс Kd, определена от изследването за свързване до насищане.
47. Общото специфично свързване следва последователно да е в рамките на приемливия диапазон от 20 $\pm$ 5%, когато средната измерена концентрация на общата радиоактивност, добавена във всяка ямка, е 1 nM в сериите. Случайни леки отклонения извън този диапазон са допустими, но ако сериите последователно са

извън този диапазон или дадена серия излиза значително извън този диапазон, концентрацията на протеин следва да се коригира.

48. Разтворителят не следва да променя чувствителността или възпроизводимостта на изследването. Резултатите на контролата на разтворителя (ямки на ТВ) се сравняват с контролата на буфера, за да се потвърди, че използваният разтворител не влияе върху системата на изследването. Резултатите на контролата за ТВ и на контролата на буфера следва да са сравними, ако разтворителят не оказва ефект върху изследването.
49. Несвързващото вещество не следва да измести повече от 25% от [³H]-17β-естрадиол от hrERα, когато се изпитва до 10⁻³ M (OTES) или 10⁻⁴ M (ДБФ).
50. Критериите за ефективност са разработени за референтния естроген и две слаби свързващи вещества (напр. норетинодрел, норетиндрон) с използване на данни от изследването за валидиране на изследването за свързване към hrER на FW (приложение N към справка 2). 95% доверителни интервали са предоставени за средната стойност (n) +/- SD за всички контролни серии сред лабораториите, участващи във изследването за валидиране . 95% доверителни интервали са изчислени за параметрите на налагане на кривата (т.е. горна част, долна част, наклон на Хил, logIC₅₀) за референтния естроген и слабо свързващи вещества и за log₁₀RBA на слабо свързващите вещества по отношение на референтния естроген и са предоставени като критерии за ефективност за положителните контроли. В таблица 1 са дадени очакваните диапазони за параметрите на налагане на кривата, които могат да се използват като критерии за ефективност. На практика диапазонът на IC₅₀ може леко да варира въз основа на Kd на рецепторния препарат и концентрацията на лиганда.
51. Не са разработени критерии за ефективност за параметрите на налагане на кривата за изпитваните химикали поради широкия спектър на съществуващи потенциални изпитвани химикали и вариациите в потенциалните афинитети и резултати (напр. пълна крива, частична крива, без налагане на крива). Въпреки това следва да се приложи професионална преценка, когато се преглеждат резултатите от всяка серия за даден изпитван химикал. Следва да се използва достатъчен диапазон на концентрации на изпитвания химикал за ясно определяне на горната част (напр. 90—100% свързване) на конкурентната крива. Варирането между повторенията при всяка концентрация на изпитван химикал, както и между трите непаралелни серии следва да е разумно и обосновано от научна гледна точка. Контролите от всяка серия за даден изпитван химикал следва да се доближават до измерванията на ефективността, съобщени за това изследване на FW, и да са последователни с данните за контроли от предходни периоди от всяка съответна лаборатория.

АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

Изследване на свързване до насищане

52. Измерват се както общото, така и неспецифичното свързване. От тези стойности специфичното свързване на увеличаващи се концентрации на [^3H]-17 β -естрадиол при равновесни условия се изчислява чрез изваждане на неспецифичното от общото свързване. Графиката на специфичното свързване спрямо концентрацията на [^3H]-17 β -естрадиол следва да достигне върха за максималното специфично свързване, показателно за насищането на hrER α с [^3H]-17 β -естрадиол. Освен това анализът на данните следва да документира свързването на [^3H]-17 β -естрадиол с единично място на свързване с висок афинитет. Неспецифичното, общото и специфичното свързване следва да се показва на кривата за свързване до насищане. Допълнителният анализ на тези данни следва да използва анализ на нелинейна регресия (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995) с окончателно представяне на данните като диаграма на Scatchard.
53. Анализът на данните следва да определи V_{max} и K_d от самостоятелните данни за общо свързване с използване на предположението, че неспецифичното свързване е линейно, освен ако не е предоставена обосновка за използване на различен метод. Освен това следва да се използва надеждна регресия, когато се определя най-доброто съвпадение, освен ако не е предоставена обосновка. Избраният метод за надеждна регресия следва да бъде посочен. Корекция за изчерпване на лиганд (напр. използване на метода на Swillens 1995) следва винаги да се използва, когато се определя V_{max} и K_d от данни за свързване до насищане.

Изследване на конкурентно свързване

54. Кривата на конкурентно свързване се изчертава като специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол спрямо концентрацията ($\log_{10}$ единици) на конкурента. Концентрацията на изпитвания химикал, която инхибира 50% от максималното специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол, е стойността на IC_{50} .
55. Оценките на логаритмичните (IC_{50}) стойности за положителните контроли (напр. референтен естроген и слабо свързващо вещество) следва да се определят с използване на подходящ софтуер за нелинейно налагане на крива за вписване на уравнението на Хил с четири параметъра, (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995 г.). Горната част, долната част, наклонът и логаритмичната стойност (IC_{50}) обикновено следва да се оставят неограничени при налагането на тези криви. Следва да се използва надеждна регресия, когато се определя най-доброто съвпадение, освен ако не е предоставена обосновка. Не следва да се използва корекция за изчерпване на лиганд. След първоначалния анализ всяка крива на свързване следва да се прегледа, за да се гарантира подходящо налагане върху модела. Относителният афинитет на свързване (RBA) за слабо свързващо вещество следва да се изчисли като процент на логаритъма (IC_{50}) за слабото свързващо вещество по отношение на логаритъма (IC_{50}) за 17 β -естрадиол. Резултатите от

положителните контроли и контролата на несвързващо вещество следва да се оценят с използване на измервания на ефективността на изследването, описани в точки 45-50 на настоящото Допълнение 2.

56. Данните за всички изпитвани химикали следва да се анализират с използване на поетапен подход, за да се гарантира, че данните са анализирани по подходящ начин и че всяка крива на конкурентно свързване е правилно класифицирана. Препоръчва се всяка серия за даден изпитван химикал първо да премине през стандартизиран анализ на данни, който е идентичен на този, използван за референтния естроген и контролите на слабо свързващо вещество (вж. точка 55 на настоящото Допълнение 3). След приключването му следва да се извърши технически преглед на параметрите на налагане на кривата, както и визуален преглед доколко добре данните съвпадат с генерираната крива на конкурентно свързване за всяка серия. По време на този технически преглед наблюденията на зависимо от концентрацията намаляване на процента на специфично свързан [^3H]-17 β -естрадиол, слабата променливост измежду техническите повторения при всяка концентрация на химикала и съгласуваността на параметрите на налагане в трите серии са добър индикатор, че изследването и анализите на данни са проведени по подходящ начин.

Тълкуване на данните

57. При условие че всички критерии за приемливост са изпълнени, даден изпитван химикал се счита за свързващ се с hrER α , ако кривата на свързване може да бъде наложена и най-ниската точка върху кривата на отклик в рамките на диапазона на данните е по-малка 50% (Фигура 1).

58. При условие че са изпълнени всички критерии за приемливост, даден изпитван химикал се счита за несвързващ се с hrER α , ако:

- Кривата на свързване може да бъде наложена и най-ниската точка на наложената крива на отклик в рамките на диапазона на данните е над 75% или
- Кривата на свързване не може да бъде наложена и най-ниският неизгладен среден процент на свързване измежду групите на концентрация в данните е над 75%.

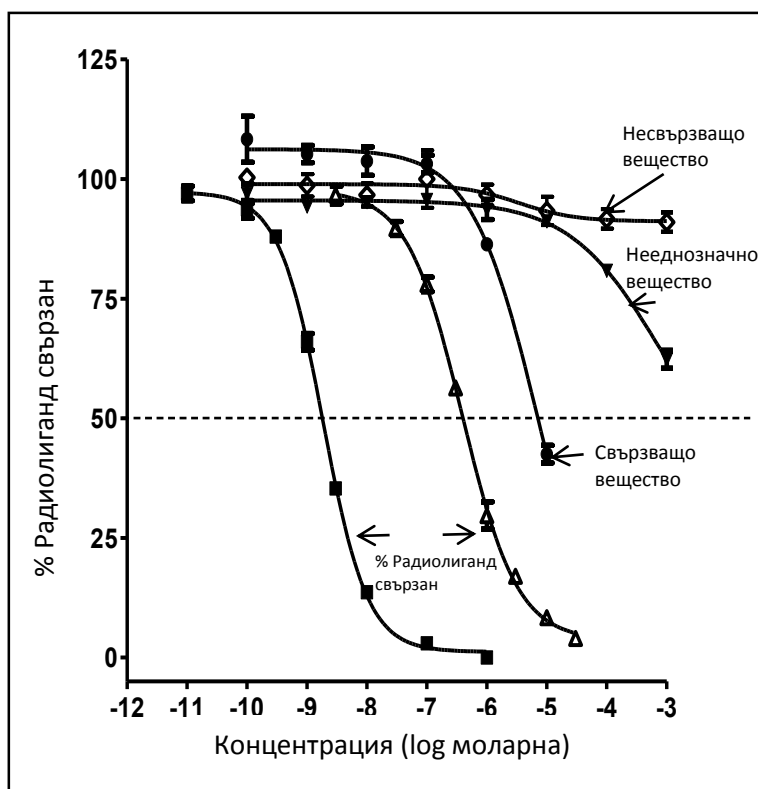
59. Изпитваните химикали се считат за нееднозначни, ако никое от горните условия не е изпълнено (напр. най-ниската точка на наложената крива на отклик е между 76 – 51%).

Таблица 7: Критерии за присвояване на класификация въз основа на крива на конкурентно свързване за даден изпитван химикал.

Класифициране	Критерии
Свързващо вещество ^a	Кривата на свързване може да бъде наложена. Най-ниската точка върху кривата на отклик в рамките на диапазона на данните

	е по-малка от 50%.
Несвързващо вещество ^б	Ако кривата на свързване може да бъде наложена, най-ниската точка върху наложената крива на отклик в рамките на диапазона на данните е над 75%. Ако кривата на свързване не може да бъде наложена, най-ниският неизгладен среден процент на свързване измежду групите на концентрация в данните е над 75%.
Нееднозначно вещество ^в	Всяка изпитвана серия, която не е нито свързващо, нито несвързващо вещество (<i>напр.</i> най-ниската точка на наложената крива на отклик е между 76 – 51%).

Фигура 1: Примери за класифициране на изпитван химикал с използване на крива на конкурентно свързване.



60. Многобройните проведени в лаборатория серии за изпитван химикал се комбинират с присвояване на цифрови стойности на всяка серия и се осредняват за сериите, както е показано в Таблица 8. Резултатите за комбинираните серии във всяка лаборатория се сравняват с очакваната класификация за всеки изпитван химикал.

Таблица 8: Метод за класифициране на изпитван химикал с използване на множество серии в дадена лаборатория

За присвояване на стойност на всяка серия:	
Класифициране	Цифрова стойност
Свързващо вещество	2
Нееднозначно вещество	1
Несвързващо вещество	0
За класифициране на средна цифрова стойност за сериите:	
Класифициране	Цифрова стойност
Свързващо вещество	Средна стойност $\geq 1,5$
Нееднозначно вещество	$0,5 \leq \text{средна стойност} < 1,5$
Несвързващо вещество	Средна стойност $< 0,5$

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

61. Вж. точка 24 от „**КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА СВЪРЗВАНЕ КЪМ hrER**“ от настоящия метод на изпитване.

Допълнение 2,1

СПИСЪК НА ТЕРМИНИТЕ

[³H]E2: 17 β -естрадиол, радиомаркиран с тритий.

DCC: въглен, покрит с декстран.

E2: немаркиран 17 β -естрадиол (инертен).

Буфер, използван в изследването: 10 mM тризаминотетан, 10 mg говежди серумен албумин/ml, 2 mM дитиотреитол, 10% глицерол, 0,2 mM левпептин, pH 7,5.

hrER α : човешки рекомбинантен естрогенен рецептор алфа (свързваща се с лиганд област).

Повторение: една от множество ямки, които съдържат едно и също съдържание с едни и същи концентрации и се изследват паралелно в рамките на единична серия. В настоящия протокол всяка концентрация на изпитван химикал се изпитва три пъти; т.е. има три повторения, които се изследват едновременно с всяка концентрация на изпитван химикал.

Серия: пълен набор от паралелно изпитвани ямки на микротитърни плаки за изследване, които осигуряват цялата информация, необходима за характеризиране на свързването на изпитван химикал към hrER α (а именно общ [³H]-17 β -естрадиол, добавен в ямката на изследването, максимално свързване на [³H]-17 β -естрадиол към hrER α , неспецифично свързване и общо свързване при различни концентрации на изпитвания химикал). Една серия може да се състои и само от една ямка за изследване (т.е. повторение) на концентрация, но тъй като настоящият протокол изисква трикратен анализ, една серия се състои от три ямки за изследване на концентрация. Освен това настоящият протокол изисква три независими (т.е. непаралелни) серии на химикал.

Допълнение 2,2

ТИПИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ДО НАСИЩАНЕ С [³H]-17β-ЕСТРАДИОЛ С ТРИ ЯМКИ ЗА ПОВТОРЕНИЕ

Типично изследване до насищане с [³ H]-17β-естрадиол с три ямки за повторение											
Местоположение	Повторение	Код на тип ямка	Първоначална концентрация на горещ E2 (nM)	Обем на горещ E2 (μl)	Окончателна концентрация на горещ E2 (nM)	Първоначална концентрация на студен E2 (nM)	Обем на студен E2 (μl)	Окончателна концентрация на студен E2 (nM)	Обем на буфера (μl)	Обем на рецептора (μl)	Общ обем в ямките
A1	1	3	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	3	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	3	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	3	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	3	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	3	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	3	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	3	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	3	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	3	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	3	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	3	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	3	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	3	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	3	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	3	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	3	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	3	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	3	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	3	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B9	3	3	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	3	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	3	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	3	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	ГС	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	ГС	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	ГС	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	ГС	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	ГС	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	ГС	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	ГС	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	ГС	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	ГС	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	ГС	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	ГС	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	ГС	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160

Типично изследване до насищане с [3H]-17β-естрадиол с три ямки за повторение

Местоположение	Повторение	Код на тип ямка	Първоначална концентрация на горещ E2 (nM)	Обем на горещ E2 (μl)	Окончателна концентрация на горещ E2 (nM)	Първоначална концентрация на студен E2 (nM)	Обем на студен E2 (μl)	Окончателна концентрация на студен E2 (nM)	Обем на буфера (μl)	Обем на рецептора (μl)	Общ обем в ямките
E1	1	ГС	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	ГС	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	ГС	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	ГС	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	ГС	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	ГС	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	ГС	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	ГС	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	ГС	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	ГС	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	ГС	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	ГС	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Горещ	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Горещ	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Горещ	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Горещ	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Горещ	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Горещ	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Горещ	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Горещ	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Горещ	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Горещ	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Горещ	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Горещ	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Горещ	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Горещ	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Горещ	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Горещ	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Горещ	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Горещ	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Горещ	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Горещ	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Горещ	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Горещ	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Горещ	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Горещ	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Имайте предвид, че „горещите“ ямки са празни по време на инкубация. 40 μl се добавят само за сцинтилационно броене.

Допълнение 2.3: Схема на ямка на сравнително изследване на свързване

Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
S	A1	1	общо свързване	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	общо свързване	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	общо свързване	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	общо свързване	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	общо свързване	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	общо свързване	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	студен E2 (висок)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	студен E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	студен E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	студен E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	студен E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	студен E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	студен E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	студен E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	студен E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	студен E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	студен E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	студен E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	студен E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	студен E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	студен E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	студен E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	студен E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	студен E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	студен E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	студен E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	студен E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	студен E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	празна	празна	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	празна	празна	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	празна	празна	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	норетинодрел	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	норетинодрел	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	норетинодрел	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	норетинодрел	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	норетинодрел	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	норетинодрел	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	норетинодрел	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	норетинодрел	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	норетинодрел	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	норетинодрел	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	норетинодрел	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	норетинодрел	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване												
Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2)(μl)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
S	E1	1	норетинодрел	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	норетинодрел	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	норетинодрел	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	норетинодрел	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	норетинодрел	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	норетинодрел	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	норетинодрел	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	норетинодрел	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	норетинодрел	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	норетинодрел	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	норетинодрел	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	норетинодрел	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	горещ	3	3	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	контрола на	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Имайте предвид, че „горещите“ ямки са празни по време на инкубация. 40 μl се добавят само за сцинтилационно броене.

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване													
Плоча	Местоположен ие	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μL)	Обем на буфера (μL)	Обем на маркера (Голям E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)	
P1	A1	1	общо свързване	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A2	2	общо свързване	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A3	3	общо свързване	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A4	1	общо свързване	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A5	2	общо свързване	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A6	3	общо свързване	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-	
P1	A7	1	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A8	2	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A9	3	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A10	1	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A11	2	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	A12	3	студен E2	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	B1	1	Изпитван	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B2	2	Изпитван	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B3	3	Изпитван	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	B4	1	Изпитван	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B5	2	Изпитван	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B6	3	Изпитван	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	B7	1	Изпитван	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B8	2	Изпитван	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B9	3	Изпитван	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	B10	1	Изпитван	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	B11	2	Изпитван	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	B12	3	Изпитван	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	C1	1	Изпитван	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C2	2	Изпитван	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C3	3	Изпитван	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	C4	1	Изпитван	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C5	2	Изпитван	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C6	3	Изпитван	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08	
P1	C7	1	Изпитван	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C8	2	Изпитван	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C9	3	Изпитван	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09	
P1	C10	1	Изпитван	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	C11	2	Изпитван	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	C12	3	Изпитван	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	D1	1	Изпитван	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D2	2	Изпитван	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D3	3	Изпитван	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03	
P1	D4	1	Изпитван	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D5	2	Изпитван	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D6	3	Изпитван	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04	
P1	D7	1	Изпитван	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D8	2	Изпитван	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D9	3	Изпитван	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05	
P1	D10	1	Изпитван	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	D11	2	Изпитван	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	D12	3	Изпитван	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	E1	1	Изпитван	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	E2	2	Изпитван	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	
P1	E3	3	Изпитван	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07	

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване

Площ	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μL)	Обем на буфера (μL)	Обем на маркера (Горещ F2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μL)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
P1	E4	1	Изпитван	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Изпитван	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Изпитван	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Изпитван	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Изпитван	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Изпитван	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Изпитван	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Изпитван	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Изпитван	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Изпитван	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Изпитван	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Изпитван	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Изпитван	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Изпитван	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Изпитван	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Изпитван	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Изпитван	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Изпитван	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Изпитван	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Изпитван	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Изпитван	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	Изпитван	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Изпитван	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Изпитван	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Изпитван	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Изпитван	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Изпитван	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Изпитван	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Изпитван	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Изпитван	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Изпитван	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Изпитван	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Изпитван	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	норетинодрел	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	норетинодрел	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	норетинодрел	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	норетинодрел	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	норетинодрел	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	норетинодрел	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	студен E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	студен E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	студен E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	студен E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	студен E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	студен E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	

Допълнение 3

ИЗСЛЕДВАНЕ *IN VITRO* ЗА СВЪРЗВАНЕ НА ЕСТРОГЕНЕН РЕЦЕПТОР НА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИЯ ИНСТИТУТ ЗА ОЦЕНКА НА ХИМИКАЛИ (CERI), ИЗПОЛЗВАЩО ЧОВЕШКИ РЕКОМБИНАНТЕН ERA ЛИГАНД-СВЪРЗВАЩ ДОМЕЙН НА ПРОТЕИН

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

1. Това изследване *in vitro* на насищането на естрогенен рецептор (ER α) и на конкурентното свързване използва лиганд-свързващ домейн (LBD) на човешкия ER α (hrER α). Този модел на протеин е произведен от Изследователския институт за оценка на химикали (CERI), Япония, и съществува като глутатион-S-трансфераза (GST) фузионен протеин, който се експресира в *E. coli*. Протоколът на CERI е преминал през международно многолабораторно изследването за валидиране (2), което е доказало неговата относимост и надеждност за целта на изследването.
2. Това изследване представлява скринингова процедура за идентифициране на вещества, които могат да се свързват с hrER α . То се използва за определяне на способността на даден изпитван химикал да се конкурира със 17 β -естрадиол за свързване с hrER α -LBD. Количествените резултати на изследването могат да включват IC₅₀ (мярка за концентрацията на изпитван химикал, необходима за изместване на половината от [³H]-17 β -естрадиол от hrER α) и относителните афинитети на свързване на изпитвани химикали за hrER α в сравнение със 17 β -естрадиол. За целите на химичен скрининг приемливите качествени резултати на изследването могат да включват класификации на изпитвани химикали като свързващи hrER α , не свързващи или нееднозначни въз основа на критериите, описани за кривите на свързване.
3. Изследването използва радиоактивен лиганд, който изисква лабораторията да притежава лиценз за радиоактивни материали. Всички процедури с радиоизотопи и опасни химикали следва да спазват разпоредбите и процедурите, както са описани от националното законодателство.
4. Разделите „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“ и „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО СВЪРЗВАНЕ НА ” hrER“ следва да бъдат прочетени, преди да се използва настоящото изследване за регулаторни цели. Използваните в настоящите TG определения и съкращения са описани в Допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО (ВЖ. СЪЩО „ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ“)

5. Изследването за свързване с hrER α измерва способността на радиомаркиран лиганд ([³H]17 β -естрадиол) да се свързва с ER в присъствието на нарастващи концентрации на изпитван химикал (т.е. конкурент). Изпитваните химикали, които имат висок

афинитет към ER, се конкурират с радиомаркирания лиганд при по-ниска концентрация в сравнение с химикалите с по-нисък афинитет към рецептора.

6. Това изследване се състои от два основни компонента: експеримент за свързване до насищане с цел характеризиране на параметрите на взаимодействието рецептор – лиганд, последван от експеримент за конкурентно свързване, който характеризира конкуренцията между изпитван химикал и радиомаркиран лиганд за свързване към ER.
7. Целта на експеримента за свързване до насищане е да характеризира специална партида рецептори за афинитет на свързване и брой при подготовка за експеримента на конкурентно свързване. Експериментът за свързване до насищане измерва, при равновесни условия, афинитета на фиксирана концентрация на естрогенния рецептор за неговия естествен лиганд (представен от дисоциационна константа, K_d) и концентрацията на активните места на рецептора (B_{max}).
8. Експериментът за свързване до насищане измерва афинитета на дадено вещество да се конкурира с [^3H]17 β -естрадиол за свързване с ER. Афинитетът се определя количествено от концентрацията на изпитван химикал, която, при равновесие, инхибира 50% от специфичното свързване на [^3H]17 β -естрадиол (наричана „инхибиторна концентрация 50%“ или IC_{50}). Това може да се оцени и с използване на относителния афинитет на свързване (RBA, по отношение на IC_{50} на естрадиол, измерен отделно в същата серия). Експериментът за конкурентно свързване измерва свързването на [^3H]17 β -естрадиол при фиксирана концентрация в присъствието на широк диапазон (осем порядъка) на концентрации на изпитван химикал. След това данните се вписват, където е възможно, във форма на уравнение на Хил (Хил, 1910), което описва изместването на радиолиганда от конкурентно свързващо вещество на едно място. Степента на изместване на радиомаркирания естрадиол при равновесие се използва за характеризиране на изпитвания химикал като свързващ, несвързващ или предизвикващ нееднозначен отклик.

ПРОЦЕДУРА

Демонстриране на приемлива ефективност на hrER α протеин

9. Преди рутинно провеждане на изследвания за насищане и конкурентно свързване, всяка нова партида hrER α следва да демонстрира правилно функциониране в лабораторията, в която ще се използва. За демонстриране на ефективност следва да се използва двустъпков процес. Тези стъпки са следните:
 - Проведете изследване за насищане и свързване на 3H]-17 β -естрадиол, за да се демонстрира специфичност и насищане на hrER α . Анализът на нелинейна регресия на тези данни (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995) и последващата диаграма на Scatchard следва да документират афинитета на свързване с hrER α на

[3H]-17 β -естрадиол (Kd) и броя на рецепторите (Bmax) за определена партида на hrER α .

- Проведете изследване за конкурентно свързване с използване на контролните вещества (референтен естроген (17 β -естрадиол), слабо свързващо вещество (напр. норетинодрел или норетиндрон) и несвързващо вещество (октилтриетоксисилан, OTES). Всяка лаборатория следва да определи база данни от предходни периоди за документиране на последователността на IC50 и съответните стойности за референтния естроген и слабо свързващо вещество измежду експериментите и различните партии на hrER α . Освен това параметрите на кривите на конкурентно свързване за контролните вещества следва да са в границите на 95%-я доверителен интервал (вж. Таблица 1), които са разработени с използване на данни от лаборатории, които са участвали във изследването за валидиране на това изследване (2).

Таблица 1: Критерии за ефективност, разработени за референтния естроген и слабо свързващо вещество, изследване за свързване на hrER на CERI.

Вещество	Параметър	Средно ^a	Стандартно отклонение (n)	95%-и доверителни интервали ^b	
				Долна граница	Горна граница
17 β -естрадиол	Top	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Bottom	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	HillSlope	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Норетинодрел	Top	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Bottom	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Норетиндрон ^b	Top	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Bottom	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Наклон на Хил	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Средните стойности $\pm$ стандартно отклонение (CO) за (размерът на извадката (n) са изчислени с използване на оценки на съвпадането на кривата (уравнение на Хил с 4 параметъра) контролни серии, проведени в четири лаборатории по време на изследването за валидиране (вж. Приложение N на препратка 2).

^b 95%та доверителност се предоставя като насоки за критериите за приемливост.

^b Изпитването на норетиндрон не е задължително за подзадача 4 по време на изследването за валидиране (вж. препратка 2, вж. подзадача 4). Следователно средните стойности $\pm$ CO (n) са изчислени с използване на оценки на налагането на кривата (уравнение на Хил с 4 параметъра) за контролни серии, проведени в две лаборатории.

Диапазонът за IC₅₀ зависи от Kd при подготовка на рецептора и концентрацията на радиомаркирания лиганд, използван във всяка лаборатория. Приемлива е подходяща корекция за диапазона на IC₅₀ въз основа на условията, използвани за провеждане на изследването.

Доказване на пригодността на лабораторията

- Вж. точки 17 и 18 и таблица 2 в „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА СВЪРЗВАНЕ КЪМ hrER“ от настоящия метод на изпитване. Всяко изследване (на насищане и конкурентно свързване) следва да се състои от три независими серии (т.е. с пресни разредени разтвори на рецептор, химикали и реактиви) в различни дни и всяка серия следва да съдържа три повторения.

Определяне на концентрацията на рецептора (hrER α)

- Концентрацията на активния рецептор леко варира според партидата и условията на съхранение. Поради тази причина концентрацията на активния рецептор следва да се определи така, както е получена от доставчика. Това ще доведе до подходящата концентрация на активния рецептор към момента на провеждане на серията.
- При условия, отговарящи на конкурентно свързване (т.е. 0,5 nM [³H]-естрадиол), номинални концентрации на рецептор от 0,1, 0,2, 0,4 и 0,6 nM следва да се инкубират в отсъствието (общо свързване) и присъствието (неспецифично свързване) на 1 μ M

немаркиран естрадиол. Специфичното свързване, изчислено като разликата между общото и неспецифичното свързване, се изчертава като зависимост спрямо номиналната концентрация на рецептора. Концентрацията на рецептор, която дава стойности на специфично свързване, съответстващи на 40% от добавения радиомаркер, е свързана със съответната концентрация на рецептора и тази концентрация на рецептора следва да се използва в опитите за насищане и конкурентно свързване. Често на това условие отговаря окончателна концентрация на hrER от 0,2 nM.

13. Ако критерият за 40% не може да бъде удовлетворен, следва да се провери настройката на експеримента за възможни грешки. Невъзможността за постигане на критерия за 40% може да сочи, че в рекомбинантната партида има много малко количество активен рецептор и тогава следва да се обмисли използването на друга партида рецептор.

Изследване на насищане

14. Следва да се оценят три пъти осем увеличаващи се концентрации на [^3H]-17 β -естрадиол при спазване на следните три условия (вж. Таблица 2):
 - а. В отсъствието на немаркиран 17 β -естрадиол и присъствието на ER. Това е определянето на тоталното свързване чрез измерване на радиоактивността в ямките, в които има само [^3H]-17 β -естрадиол.
 - б. В присъствието на 2000 пъти по-голяма концентрация на немаркиран 17 β -естрадиол спрямо маркиран 17 β -естрадиол и присъствието на ER. Целта на това условие да се наситят местата на активно свързване с немаркиран 17 β -естрадиол и чрез измерване на радиоактивността в тези ямки да се определи неспецифичното свързване. Всяко оставащо количество горещ естрадиол, който може да се свърже с рецептора, се счита за свързан в неспецифично място, тъй като студеният естрадиол следва да е с такава висока концентрация, при която той се свързва с всички налични специфични места на рецептора.
 - в. В отсъствието на немаркиран 17 β -естрадиол и отсъствието на ER (определяне на обща радиоактивност)

Приготвяне на [^3H]-17 β -естрадиол, разтвори на немаркиран 17 β -естрадиол и hrERa

15. 40 nM разтвор на [^3H]-17 β -естрадиол следва да се приготви от 1 μM изходен разтвор на [^3H]-17 β -естрадиол в DMSO чрез добавяне на DMSO (за приготвяне на 200 nM) и буфер, използван за изследването, при стайна температура (за приготвяне на 40 nM). С използване на този 40 nM разтвор се приготвят сериите на разреден [^3H]-17 β -естрадиол, вариращи от 0,313 nM до 40 nM, с буфер, използван за изследването, при стайна температура (както е представено в ред 12 на Таблица 2). Окончателните концентрации на изследването, вариращи от 0,0313 до 4,0 nM, се получават чрез

добавяне на 10 µl от тези разтвори към съответните ямки на 96-ямкова микротитърна плака (вж. Таблицы 2 и 3). Приготвянето на буфера, използван в изследването, изчисляването на оригиналния изходен разтвор на [³H]-17β-естрадиол въз основа на неговата специфична активност, приготвянето на разредените разтвори и определянето на концентрациите са описани подробно в протокола на CERI (2).

16. Разредените разтвори на немаркиран 17β-естрадиол следва да се приготвят от 1 nM изходен разтвор на 17β-естрадиол чрез добавяне на буфер, използван в изследването, за да се постигнат осем увеличаващи се концентрации, които първоначално варират от 0,625 µM до 80 µM. Окончателните концентрации на изследването, вариращи от 0,0625 до 8 µM, се получават чрез добавяне на 10 µl от тези разтвори към съответните ямки на 96-ямкова микротитърна плака, предназначена за измерване на неспецифично свързване (вж. Таблицы 2 и 3). Приготвянето на разредени разтвори на немаркиран 17β-естрадиол е описано подробно в протокола на CERI (2).
17. Следва да се използва концентрацията на рецептор, който дава 40±10% специфично свързване (вж. точки 12-13). Разтворът на hrERα следва да се приготви с охладен с лед буфер, използван в изследването, непосредствено преди употреба, т.е. след като са приготвени всички ямки за общо свързване, неспецифично свързване и самостоятелен горещ лиганд.
18. 96-ямковите микротитърни плаки се приготвят както е показано в Таблица 2, с 3 повторения за всяка концентрация на [³H]-17β-естрадиол. Определянето на обема на [³H]-17β-естрадиол, немаркиран 17β-естрадиол, буфера и рецептора е дадено в Таблица 3.

Таблица 2: Схема на микротитърна плака за изследване за свързване до насищане

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	За измерване на ТВ			За измерване на NSB			За определяне на самостоятелен горещ лиганд				Немаркирани разредени разтвори на E2 за колонии 4-6 на	[³ H]E2 разредени разтвори за колонии 1-9 на плаката
A	0,0313 nM [³ H] E ₂ + EP			0,0313 nM [³ H] E ₂ + 0,0625 µM E ₂ + EP			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [³ H] E ₂ + EP			0,0625 nM [³ H] E ₂ + 0,125 µM E ₂ + EP			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
B	30,125 nM [³ H] E ₂ + EP			0,125 nM [³ H] E ₂ + 0,25 µM E ₂ + EP			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
Г	0,250 nM [³ H] E ₂ + EP			0,250 nM [³ H] E ₂ + 0,5 µM E ₂ + EP			0,250 nM				5 µM	2,5 nM

Д	0,50 nM [³ H] E ₂ + EP	0,50 nM [³ H] E ₂ + 1 μM E ₂ + EP	0,50 nM		10 μM	5 nM
Е	1,00 nM [³ H] E ₂ + EP	1,00 nM [³ H] E ₂ + 2 μM E ₂ + EP	1,00 nM		20 μM	10 nM
Ж	2,00 nM [³ H] E ₂ + EP	2,00 nM [³ H] E ₂ + 4 μM E ₂ + EP	2,00 nM		40 μM	20 nM
З	4,00 nM [³ H] E ₂ + EP	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 μM E ₂ + EP	4,00 nM		80 μM	40 nM

TB: общо свързване,

NSB: неспецифично свързване

[³H] E₂: [³H]17β-естрадиол

E₂: немаркиран 17β-естрадиол

*Посочените тук концентрации са окончателните концентрации във всяка ямка.

**Разредените разтвори на немаркиран E₂ и [³H]E₂ могат да се приготвят в различна плака.

Таблица 3: Обеми на реактив за микротитърна плака за насищане

Номер на ред		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Стъпки на подготовка		Ямки за TB			Ямки за NSB			Самостоятелен		
Обем на компоненти за ямките за реакция отгоре и ред на добавяне	Буфер	60 µl			50 µl			90 µl		
	немаркиран E2 от ред 11 в Таблица 2	-			10 µl			-		
	[3H]E2 от ред 12 в Таблица 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Общ обем на реакция		100 µl			100 µl			100 µl		
Инкубация		РЕАКЦИЯ СЛЕД 2 ЧАСА ИНКУБАЦИЯ						Количествено определяне на радиоактивността веднага след приготвяне. Без инкубация		
Третиране с 0,4% DCC		Идентификационен			Идентификационен			№		
Обем на 0,4% DCC		100 µl			100 µl			-		
Филтриране		Идентификационен номер 1.1.6.8. Не			Идентификационен номер 1.1.6.8. Не			№		
ИЗМЕРВАНЕ НА DPMS										
Количествено определяне на обема, добавян към сцинтилационен коктейл		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Ако се използва LSC за микроплаки за измерване на dpm, приготвянето на самостоятелен горещ лиганд в същата плака на изследването с ямки за ТВ и NSB не е подходящо. Самостоятелният горещ лиганд следва да се приготвя в друга плака.

** Ако се използва центрофугиране за отделяне на DCC, 50 µl от супернатанта следва да се измерят чрез LSC, за да се избегне замърсяване на DCC.

19. Микротитърните плаки на изследването за определянето на общо свързване и неспецифично свързване следва да се инкубират при стайна температура (от 22°C до 28°C) в продължение на два часа.

Измерване на [³H]-17β-естрадиол, свързан с hrERα

20. След двучасов период на инкубация, свързаният с hrERα [³H]-17β-естрадиол следва да се отдели от свободния [³H]-17β-естрадиол чрез добавяне на 100µl охладена с лед 0,4% суспензия на DCC в ямките. След това плаките следва да се поставят върху лед за 10 минути и реакционната смес и суспензията на DCC следва да се филтрират чрез прехвърляне във филтър за микротитърна плака, за отстраняване на DCC. 100 µl от филтратата след това трябва да се добави към сцинтилационна течност в LSC флакони за определяне на разпадането в минута (dpm) на флакон чрез точно сцинтилационно броене.
21. Като алтернатива, ако няма наличен филтър за микроплака, отстраняването на DCC може да се постигне чрез центрофугиране. 50 µl от супернатанта, съдържащ свързан с hrERα [³H]-17β-естрадиол, след това следва да се отдели изключително внимателно, за да се избегне всяко замърсяване на ямките от контакт с DCC, и трябва да се използва за сцинтилационно броене.
22. Условието за самостоятелен горещ лиганд се използва за определяне на разпадането в минута (dpm) на [³H]-17β-естрадиол, добавен в анализираните ямки. Радиоактивността следва да се определи количествено веднага след приготвяне. Тези ямки не следва да се инкубират и не трябва да се третират със суспензия на DCC, но тяхното съдържание следва да се прехвърли директно в сцинтилационната течност. Тези измервания демонстрират колко [³H]-17β-естрадиол в dpm е добавен към всеки набор от ямки за общото свързване и неспецифичното свързване.

Изследване на конкурентно свързване

23. Изследването за конкурентно свързване измерва свързването на една концентрация на [³H]-17β-естрадиол в присъствието на увеличаващи се концентрации на изпитван химикал. За всяка концентрация в рамките на една серия следва да се използват три паралелни повторения. Освен това следва да се проведат три непаралелни серии за всеки изпитван химикал. Изследването трябва да се проведе в една или повече 96-ямкови микротитърни плаки.

Контрол

24. При провеждане на изследването във всеки експеримент следва да се включват паралелни разтворител и контроли (т.е. референтен естроген, слабо свързващо

вещество и несвързващо вещество). Пълните криви на концентрация за референтния естроген и контролите (т.е. слабо свързващо вещество и несвързващо вещество) следва да се използват в една плака по време на всяка серия. Всички останали плаки следва да съдържат (i) висока (максимално изместване, т.е. приблизително пълно изместване на радиомаркиран лиганд) и средна (приблизително IC_{50}) концентрация на E2 и слабо свързващо вещество в три повторения; (ii) контрола на разтворителя и неспецифичното свързване, всяка в три повторения. Процедурите за приготвяне на използвания в изследването буфер, [^3H]-17 β -естрадиол, hrER α и разтворите на изпитван химикал са описани подробно в протокола на CER1 (2).

Контрола на разтворител:

25. Контролата на разтворителя показва, че разтворителят не взаимодейства с изпитваната система и измерва също така общото свързване (TB). Предпочитаният разтворител е DMSO. Като алтернатива, ако най-високата концентрация на изпитвания химикал не е разтворима в DMSO, може да се използва етанол. Концентрацията на DMSO в окончателните анализирани ямки следва да е 2,05% и може да бъде увеличена до 2,5% в случай на липса на разтворимост на изпитвания химикал. Концентрации на DMSO над 2,5% не следва да се използват поради интерференцията на по-високи концентрации на разтворителя с изследването. За изпитвани химикали, които не са разтворими в DMSO, но са разтворими в етанол, може да се използва максимум 2% етанол в изследването без интерференция.

Контрола на буфер:

26. Контролата на буфера (BC) не трябва да съдържа нито разтворител, нито изпитван химикал, но трябва да включва всички други компоненти на изследването. Резултатите на контролата на буфера се сравняват с контролата на разтворителя, за да провери, че използваният разтворител не влияе върху системата на изследването.

Силно свързващо вещество (референтен естроген)

27. 17 β -естрадиол (CAS № 50-28-2) е ендегенен лиганд и се свързва с висок афинитет с ER, подтип алфа. За всяко изследване на конкурентно свързване на hrER α следва да се приготви стандартна крива с използване на 17 β -естрадиол, за да се позволи оценка на променливостта при провеждане на изследването във времето в рамките на една и съща лаборатория. Следва да се приготвят осем разтвора на немаркиран 17 β -естрадиол в DMSO и използвания в изследването буфер, като окончателните концентрации в ямките, които се използват за окончателното разполагане на стандартната крива, са следните: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8.5}$, 10^{-9} , $10^{-9.5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Най-високата концентрация на немаркиран 17 β -естрадиол (1 μ M) следва да служи като индикатор за неспецифично свързване. Тази концентрация се разграничава чрез етикета „NSB“ в Таблица 4, въпреки че също е част от стандартната крива.

Слабо свързващо вещество

28. Следва да се включи слабо свързващо вещество (норетинодрел (CAS № 68-23-5) или, като алтернатива, норетиндрон (CAS № 68-22-4)), за да докаже чувствителността на всеки експеримент и да се позволи оценка на променливостта при провеждане на изследването във времето. Следва да се приготвят осем разтвора на слабо свързващо вещество в DMSO и използвания в изследването буфер, като окончателните концентрации в ямките са следните: $10^{-4.5}$, $10^{-5.5}$, 10^{-6} , $10^{-6.5}$, 10^{-7} , $10^{-7.5}$, 10^{-8} и 10^{-9} M.

Несвързващо вещество

29. Като отрицателна контрола (несвързващо вещество) следва да се използва октитриетоксисилан (OTES, CAS № 2943-75-1). Той гарантира, че изследването, както се провежда, открива изпитвани химикали, които не се свързват с hrER α . Следва да се приготвят осем разтвора на несвързващото вещество в DMSO и използвания в изследването буфер, като окончателните концентрации в ямките са следните: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Ди-ен-бутилфталат (DBP, CAS № 84-72-2) може да се използва като алтернативно несвързващо вещество, но да се изпитва само до 10^{-4} M. Доказано е, че максималната разтворимост на DBP в изследването е 10^{-4} M.

Концентрация на hrER α

30. Следва да се използва това количество на рецептор, което дава специфично свързване от $40 \pm 10\%$ (вж. точки 12-13 на Допълнение 3). Разтворът на hrER α следва да се приготви чрез разтваряне на функционалния hrER α в охладен с лед буфер, използван в изследването, непосредствено преди употреба.

[^{3} H]-17 β -естрадиол

31. Окончателната концентрация на [^{3} H]-17 β -естрадиол в анализираните ямки следва да е 0,5 nM.

Изпитвани химикали

32. На първо място е необходимо да се проведе тест за разтворимост, за да се определи границата на разтворимост за всеки изпитван химикал и да се идентифицира подходящия диапазон на концентрация за използване при изпълнение на протокола на изпитването. Границата на разтворимост на всеки изпитван химикал трябва първо да се определи в разтворителя и след това допълнително да се потвърди при условията на изследването. Окончателната концентрация, изпитвана в изследването, не следва да превишава 1 mM. Изпитването за определяне на диапазон включва контрола на разтворител заедно с поне 8 логаритмични последователни разреждания, започвайки с максималната приемлива концентрация (напр. 1 mM или по-ниска, въз основа на границата на разтворимост), в присъствието на забелязана мътност или преципитация (вж. също точка 35 на Допълнение 3). След определяне на диапазона на концентрация за изпитването, даден изпитван химикал следва да се изпитва с използване на 8 логаритмични концентрации, разпределени по подходящ начин,

както е определено в предходното изпитване за определяне на диапазон. Концентрациите, изпитвани във втория и третия експеримент, следва допълнително да се коригират, както е подходящо, за да характеризират по-добре кривата на отклик на концентрация, ако е необходимо.

33. Разрежданията на изпитвания химикал следва да се приготвят в подходящия разтворител (вж. точка 25 на Допълнение 3). Ако най-високата концентрация на изпитвания химикал не е разтворима в DMSO или етанол и добавянето на още разтворител би довело до това концентрацията на разтворителя в окончателната епруветка да е по-голяма от приемливата граница, най-високата концентрация може да бъде намалена до следващата по-ниска концентрация. В този случай може да се добави допълнителна концентрация в долната част на серията от концентрации. Другите концентрации в сериите следва да останат без промяна.
34. Разтворите на изпитвания химикал следва да се наблюдават отблизо, когато се добавят в ямката, тъй като изпитваният химикал може да се утаи при добавянето му в ямката. Данните за всички ямки, съдържащи преципитат, следва да се изключат от налагането на кривата и да се отбележат причините за изключването на данните.
35. Ако съществува предходна информация от други източници, която предоставя логаритъм (IC_{50}) на даден изпитван химикал, може да е подходящо разрежданията да се разпределят геометрично по-близо около очаквания логаритъм (IC_{50}) (т.е. 0,5 логаритмични единици). Окончателните резултати следва да демонстрират достатъчно разпределение на концентрациите от всяка страна на логаритъма (IC_{50}), включително „горе“ и „долу“, така че кривата на свързването да може да бъде адекватно характеризирана.

Организация на изследваната плака

36. Маркираните микротитърни плаки следва да се приготвят с използване на шестократни инкубации за контролата на разтворителя, най-високата концентрация на референтния естроген (E2), която служи и като индикатор за неспецифично свързване (NSB), контролата на буфера, осемте концентрации на контролата за несвързващо вещество (октилтриетоксисилан), седемте по-ниски концентрации на референтния естроген (E2), осемте концентрации на слабо свързващото вещество (норетинодрел или норетинодрон) и осемте концентрации на всеки изпитван химикал (ТС). Примерна схема на диаграмата на плаката за кривите на пълна концентрация за референтния естроген и контролите е дадена по-долу в Таблица 4. Допълнителни микротитърни плаки се използват за изпитвания химикал и следва да съдържат контроли на плаката (т.е. (i) висока (максимално изместване) и средна (приблизително IC_{50}) концентрация на E2 и слабо свързващото вещество в три повторения; (ii) контрола на разтворителя (като общо свързване) и неспецифично свързване, всяка по шест пъти (Таблица 5). Пример за схема на микротитърна плака за работна таблица на конкурентно изследване е предоставен в Допълнение 3.3. Посочените в работната таблица концентрации, както е тези в Таблицы 4 и 5, се

отнасят за окончателните концентрации, използвани във всяка анализирана ямка. Максималната концентрация за Е2 следва да е 1×10^{-7} М, а за слабо свързващото вещество следва да се използва най-високата концентрация, използвана за слабото свързващо вещество в плака 1. Концентрацията IC_{50} следва да се определи от лабораторията въз основа на нейната база данни за контроли от предходни периоди. Очакването е, че тази стойност ще е сходна с наблюдаваната във изследванията за валидиране (вж. Таблица 1).

Таблица 4: Схема на микротитърна плака за изследване на конкурентно свързване^{1,2}, пълни криви на концентрация за референтен естроген и контроли (плака 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Контрола на буфер и положителна контрола (E2)			Слаба положителна контрола (Норетинодрел)			Отрицателна контрола (OTES)			ТВ и NSB		
A	Празна *			1×10 ⁻⁹ M			1×10 ⁻¹⁰ M			ТВ (контрола на разтворител) (2,05% DMSO)		
B	E2 (1×10 ⁻¹¹ M)			1×10 ⁻⁸ M			1×10 ⁻⁹ M					
B	E2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			1×10 ^{-7,5} M			1×10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
Г	E2 (1×10 ^{-9,5} M)			1×10 ⁻⁷ M			1×10 ⁻⁷ M					
Д	E2 (1×10 ⁻⁹ M)			1×10 ^{-6,5} M			1×10 ⁻⁶ M			Контрола на буфер		
E	E2 (1×10 ^{-8,5} M)			1×10 ⁻⁶ M			1×10 ⁻⁵ M					
Ж	E2 (1×10 ⁻⁸ M)			1×10 ^{-5,5} M			1×10 ⁻⁴ M			Празна (за горещ)**		
З	E2 (1×10 ⁻⁷ M)			1×10 ^{-4,5} M			1×10 ⁻³ M					

¹ За всеки експеримент трябва да се извърши настройка на пробата за стандартна микротитърна плака.

² Имайте предвид, че тази микротитърна плака е направена с използване на разреждени разтвори, приготвени в плаката за разреждане, описана за стандартите в предишните раздели.

В този пример слабото свързващо вещество е норетинодрел (NE)

* наистина празна, ямката не е използвана

** празна, неизползвана по време на инкубиране, но използвана за потвърждаване на общата добавена радиоактивност.

Таблица 5: Схема на микротитърна плака за изследването на конкурентно свързване, допълнителни плаки за изпитвани химикали (ТС) и контроли на плака.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Изпитван химикал-1 (ТС-1)			Изпитван химикал-2 (ТС-2)			Изпитван химикал-3 (ТС-3)			Контрол		
А	ТС-1 (1×10^{-10} М)			ТС-2 (1×10^{-10} М)			ТС-3 (1×10^{-10} М)			Е2 (1×10^{-7} М)		

Б	ТС-1 (1×10^{-9} М)	ТС-2 (1×10^{-9} М)	ТС-3 (1×10^{-9} М)	E ₂ (IC ₅₀)
В	ТС-1 (1×10^{-8} М)	ТС-2 (1×10^{-8} М)	ТС-3 (1×10^{-8} М)	NE ($1 \times 10^{-4.5}$ М)
Г	ТС-1 (1×10^{-7} М)	ТС-2 (1×10^{-7} М)	ТС-3 (1×10^{-7} М)	NE (IC ₅₀)
Д	ТС-1 (1×10^{-6} М)	ТС-2 (1×10^{-6} М)	ТС-3 (1×10^{-6} М)	NSB (10^{-6} М E ₂)
Е	ТС-1 (1×10^{-5} М)	ТС-2 (1×10^{-5} М)	ТС-3 (1×10^{-5} М)	
Ж	ТС-1 (1×10^{-4} М)	ТС-2 (1×10^{-4} М)	ТС-3 (1×10^{-4} М)	ТВ (Контрола на разтворител)
З	ТС-1 (1×10^{-3} М)	ТС-2 (1×10^{-3} М)	ТС-3 (1×10^{-3} М)	

В този пример слабо свързващо вещество е норетинодрел (NE)

Завършване на изследване на конкурентно свързване

37. С изключение на ямките за общо свързване и празните ямки (за горещ), както е показано в Таблица 6, 50 µl от използвания в изследването буфер следва да се постави във всяка ямка и да се смеси с 10 µl от контролата на разтворителя, референтен естроген (E₂), слабо свързващо вещество и изпитвани химикали, съответно 10 µl от разтвор на 5 nM [3H]-17β-естрадиол. След това във всяка плака се добавя 30µl охладен с лед разтвор на рецептор и внимателно се смесва. Разтворът на hrERα следва да е последния реактив за добавяне. Микротитърните плаки на изследването следва да се инкубират при стайна температура (от 22° до 28°C) в продължение на 2 часа.

Таблица 6: Обем на компонентите на изследването на конкурентно свързване към hrER, микротитърни плаки

Стъпки на подготовка по номер на ред		Различни от ямки за ТВ	Ямки за ТВ	Празна (за горещ)
Обем на компоненти за ямките за реакция отгоре и ред на добавяне	Използван в изследването буфер със стайна температура	50 µl	60 µl	90 µl
	Немаркиран E ₂ , слабо свързващо вещество, несвързващо вещество, разтворител и изпитвани химикали*	10 µl	-	-
	[3H]-17β-естрадиол за получаване на окончателна концентрация от 0,5 nM (т.е. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Концентрация на rERα, както е определена (вж. точки 12-13)	30 µl	30 µl	-
Общ обем във всяка ямка на изследването		100 µl	100 µl	100 µl

*правилно приготвен за получаване на окончателна концентрация в рамките на приемливата концентрация на разтворителя

38. Количественото определяне на [3H]-17β-естрадиол, свързан с hrERα, след отделяне на [3H]-17β-естрадиол, свързан с hrERα от свободен [3H]-17β-естрадиол чрез добавяне на 100 µl охладена с лед суспензия на DCC във всяка ямка, следва да се извърши след това както е описано в точки 21-23 на Допълнение 3 за изследването на свързване до насищане.

39. Ямките G10-12 и H10-12 (идентифицирани като празни (за горещ) в Таблица 4) представят dpm на [³H]-маркиран естрадиол в 10 µl. 10 µl аликвотна част следва да се достави директно в сцинтилационната течност.

Критерии за приемливост

Изследване на свързване до насищане

40. Кривата на специфично свързване следва да достигне върха като използваните увеличаващи се концентрации на [³H]-17β-естрадиол, което посочва насищане на hrERα с лиганд.
41. Специфичното свързване при 0,5 nM от [³H]-17β-естрадиол следва да е в рамките на приемливия диапазон от 30% до 50% на средната измерена обща радиоактивност, добавена в сериите. Случайни леки отклонения извън този диапазон са допустими, но ако сериите последователно са извън този диапазон или дадена серия излиза значително извън този диапазон, концентрацията на протеин следва да се коригира и изследването за насищане да се повтори.
42. Данните следва да произведат линейна диаграма на Scatchard.
43. Неспецифичното свързване не трябва да е прекомерно. Стойността на неспецифичното свързване следва обикновено да е <35% от общото свързване. Въпреки това съотношението може от време на време да надвишава тази граница, когато се измерва много нисък dpm за най-ниската концентрация на радиомаркиран изпитван 17β-естрадиол.

Изследване на конкурентно свързване

44. Увеличаващите се концентрации на немаркиран 17β-естрадиол следва да изместят [³H]-17β-естрадиол от рецептора по начин, съответстващ на конкурентно свързване в едно място.
45. Стойността на IC₅₀ за референтния естроген (т.е. 17β-естрадиол) следва да е приблизително равна на моларната концентрация на [³H]-17β-естрадиол плюс K_d, определена от изследването за свързване до насищане.
46. Общото специфично свързване следва да последователно да е в рамките на приемливия диапазон от 40 ± 10 %, когато средната измерена концентрация на общата радиоактивност, добавена във всяка ямка, е 0,5 nM в сериите. Случайни леки отклонения извън този диапазон са допустими, но ако сериите последователно са извън този диапазон или дадена серия излиза значително извън този диапазон, концентрацията на протеин следва да се коригира.
47. Разтворителят не следва да променя чувствителността или възпроизводимостта на изследването. Резултатите на контролата на разтворителя (ямки на ТВ) се сравняват с контролата на буфера, за да се потвърди, че използваният разтворител не влияе върху

системата на изследването. Резултатите на контролата за ТВ и на контролата на буфера следва да са сравними, ако разтворителят не оказва ефект върху изследването.

48. Несвързващото вещество не следва да измести повече от 25% от [^3H]-17 β -естрадиол от hrER α , когато се изпитва до 10^{-3} M (OTES) или 10^{-4} M (DBP).
49. Критериите за ефективност са разработени за референтния естроген и две слаби свързващи вещества (напр. норетинодрел, норетиндрон) с използване на данни от изследването за валидиране за изпитването за свързване на hrER на CERI (Приложение N на препратка 2). 95% доверителни интервали са предоставени за средната стойност $\pm$ CO (n) на всички контроли измежду четири лаборатории, които са участвали във изследването за валидиране. 95% доверителни интервали са изчислени за параметрите на налагане на кривата (т.е. горна част, долна част, наклон на Хил и Log IC $_{50}$) за референтния естроген и слабо свързващи вещества и Log $_{10}$ RBA на слабо свързващи вещества по отношение на референтния естроген. В таблица 1 са дадени очакваните диапазони за параметрите на налагане на кривата, които могат да се използват като критерии за ефективност. На практика, диапазонът на IC $_{50}$ може леко да варира въз основа на експериментално получената Kd на приготвянето на рецептора и концентрацията на лиганд, използвани за изследването.
50. Не са разработени критерии за ефективност за параметрите на налагане на кривата за изпитваните химикали поради широкия спектър на съществуващи потенциални изпитвани химикали и вариациите в потенциалните афинитети и резултати (напр. пълна крива, частична крива, без налагане на крива). Въпреки това следва да се приложи професионална преценка, когато се преглеждат резултатите от всяка серия за даден изпитван химикал. Следва да се използва достатъчен диапазон на концентрации на изпитвания химикал за ясно определяне на горната част (напр. 90—100% свързване) на конкурентната крива. Варирането между повторенията при всяка концентрация на изпитван химикал, както и между трите непаралелни серии следва да е разумно и обосновано от научна гледна точка. Контролите от всяка серия за даден изпитван химикал следва да се доближават до измерванията на ефективност, съобщени за това изследване на CERI, и да са последователни с данните за контроли от предходни периоди на всяка съответна лаборатория.

АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

Изследване на свързване до насищане

51. Измерват се както общото, така и неспецифичното свързване. От тези стойности специфичното свързване на увеличаващи се концентрации на [^3H]-17 β -естрадиол при равновесни условия се изчислява чрез изваждане на неспецифичното от общото свързване. Графиката на специфичното свързване спрямо концентрацията на [^3H]-17 β -естрадиол следва да достигне върха за максималното специфично свързване, показателно за насищането на hrER α с [^3H]-17 β -естрадиол. Освен това анализът на данните следва да документира свързването на [^3H]-17 β -естрадиол с единично място

на свързване с висок афинитет. Неспецифичното, общото и специфичното свързване следва да се показва на кривата за свързване до насищане. Допълнителният анализ на тези данни следва да използва анализ на нелинейна регресия (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995) с окончателно представяне на данните като диаграма на Scatchard.

52. Анализът на данните следва да определи V_{max} и K_d от самостоятелните данни за общо свързване с използване на предположението, че неспецифичното свързване е линейно, освен ако не е предоставена обосновка за използване на различен метод. Освен това следва да се използва надеждна регресия, когато се определя най-доброто съвпадение, освен ако не е предоставена обосновка. Избраният метод за надеждна регресия следва да бъде посочен. Корекция за изчерпване на лиганд (напр. използване на метода на Swillens 1995) следва винаги да се използва, когато се определя V_{max} и K_d от данни за свързване до насищане.

Изследване на конкурентно свързване

53. Кривата на конкурентно свързване се изчертава като специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол спрямо концентрацията ($\log_{10}$ единици) на конкурента. Концентрацията на изпитвания химикал, която инхибира 50% от максималното специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол, е стойността на IC_{50} .
54. Оценките на логаритмичните (IC_{50}) стойности за положителните контроли (напр. референтен естроген и слабо свързващо вещество) следва да се определят с използване на подходящ софтуер за нелинейно налагане на крива за вписване на уравнението на Хил с четири параметъра, (напр. BioSoft; McPherson, 1985 г.; Motulsky, 1995 г.). Горната част, долната част, наклонът и логаритмичната стойност (IC_{50}) обикновено следва да се оставят неограничени при налагането на тези криви. Следва да се използва надеждна регресия, когато се определя най-доброто съвпадение, освен ако не е предоставена обосновка. Не следва да се използва корекция за изчерпване на лиганд. След първоначалния анализ всяка крива на свързване следва да се прегледа, за да се гарантира подходящо налагане върху модела. Относителният афинитет на свързване (RBA) за слабо свързващо вещество следва да се изчисли като процент на логаритъма (IC_{50}) за слабото свързващо вещество по отношение на логаритъма (IC_{50}) за 17 β -естрадиол. Резултатите от положителните контроли и контролата на несвързващо вещество следва да се оценят с използване на измервания на ефективността на изследването, описани в точки 44-49 на настоящото Допълнение 3.
55. Данните за всички изпитвани химикали следва да се анализират с използване на поетапен подход, за да се гарантира, че данните са анализирани по подходящ начин и че всяка крива на конкурентно свързване е правилно класифицирана. Препоръчва се всяка серия за даден изпитван химикал първо да премине през стандартизиран анализ на данни, който е идентичен на този, използван за референтния естроген и контролите на слабо свързващо вещество (вж. точка 54 на настоящото Допълнение 3).

След приключването му следва да се извърши технически преглед на параметрите на налагане на кривата, както и визуален преглед доколко добре данните съвпадат с генерираната крива на конкурентно свързване за всяка серия. По време на този технически преглед наблюденията на зависимо от концентрацията намаляване на процента на специфично свързан [³H]-17β-естрадиол, слабата променливост измежду техническите повторения при всяка концентрация на изпитвания химикал и съгласуваността на параметрите на налагане в трите серии са добър индикатор, че изследването и анализите на данни са проведени по подходящ начин.

Тълкуване на данните

56. При условие че всички критерии за приемливост са изпълнени, даден изпитван химикал се счита за свързващ се с hrERα, ако кривата на свързване може да бъде наложена и най-ниската точка върху кривата на отклик в рамките на диапазона на данните е по-малка 50% (Фигура 1).

57. При условие че са изпълнени всички критерии за приемливост, даден изпитван химикал се счита за несвързващ се с hrERα, ако:

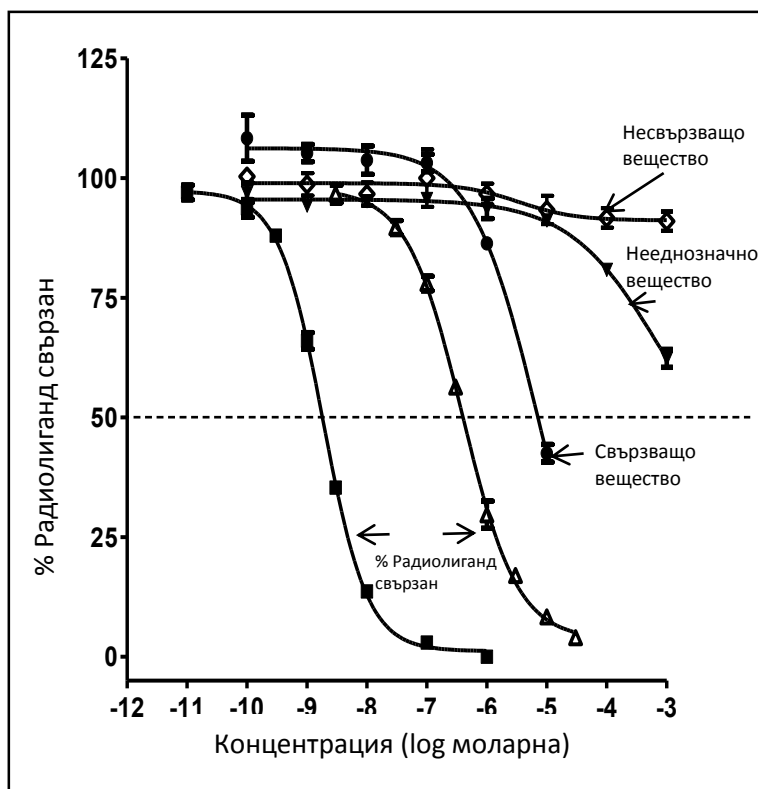
- Кривата на свързване може да бъде наложена и най-ниската точка на наложената крива на отклик в рамките на диапазона на данните е над 75% или
- Кривата на свързване не може да бъде наложена и най-ниският неизгладен среден процент на свързване измежду групите на концентрация в данните е над 75%.

58. Изпитваните химикали се считат за нееднозначни, ако никое от горните условия не е изпълнено (напр. най-ниската точка на наложената крива на отклик е между 76 – 51%).

Таблица 7: Критерии за присвояване на класификация въз основа на крива на конкурентно свързване за даден изпитван химикал.

Класифициране	Критерии
Свързващо вещество ^a	Кривата на свързване може да бъде наложена. • Най-ниската точка върху кривата на отклик в рамките на диапазона на данните е по-малка от 50%.
Несвързващо вещество ^b	Ако кривата на свързване може да бъде наложена, • най-ниската точка върху наложената крива на отклик в рамките на диапазона на данните е над 75%. Ако кривата на свързване не може да бъде наложена, • най-ниският неизгладен среден процент на свързване измежду групите на концентрация в данните е над 75%.
Нееднозначно вещество ^b	Всяка изпитвана серия, която не е нито свързващо, нито несвързващо вещество <i>(напр. най-ниската точка на наложената крива на отклик е между 76 – 51%).</i>

Фигура 1: Примери за класифициране на изпитван химикал с използване на крива на конкурентно свързване.



59. Многобройните проведени в лаборатория серии за изпитван химикал се комбинират с присвояване на цифрови стойности на всяка серия и се осредняват за сериите, както е показано в Таблица 8. Резултатите за комбинираните серии във всяка лаборатория се сравняват с очакваната класификация за всеки изпитван химикал.

Таблица 8: Метод за класифициране на изпитван химикал с използване на множество серии в дадена лаборатория

За присвояване на стойност на всяка серия:	
Класифициране	Цифрова стойност
Свързващо вещество	2
Неоднозначно вещество	1
Несвързващо вещество	0
За класифициране на средна цифрова стойност за сериите:	
Класифициране	Цифрова стойност
Свързващо вещество	Средна стойност $\geq 1,5$
Неоднозначно вещество	$0,5 \leq \text{средна стойност} < 1,5$
Несвързващо вещество	Средна стойност $< 0,5$

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

60. Вижте точка 24 от „КОМПОНЕНТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА СВЪРЗВАНЕ НА hrER“ на настоящия метод за изпитване.

Допълнение 3,1

СПИСЪК НА ТЕРМИНИТЕ

[³H]E2: 17 β -естрадиол, радиомаркиран с тритий.

DCC: въглен, покрит с декстран.

E2: немаркиран 17 β -естрадиол (инертен).

Буфер, използван в изследването: 10 mM трис-HCl, pH 7,4, съдържащ 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % глицерол, 0,2 mM левпептин, 1 mM дитиотреитол и 10 mg/ml говежди серумен албумин

hrER α : човешки рекомбинантен естрогенен рецептор алфа (свързваща се с лиганд област).

Повторение: една от множество ямки, които съдържат едно и също съдържание с едни и същи концентрации и се изследват паралелно в рамките на единична серия. В настоящия протокол всяка концентрация на изпитван химикал се изпитва три пъти; т.е. има три повторения, които се изследват едновременно с всяка концентрация на изпитван химикал.

Серия: пълен набор от паралелно изпитвани ямки на микротитърни плаки за изследване, които осигуряват цялата информация, необходима за характеризиране на свързването на изпитван химикал към hrER α (а именно общ [³H]-17 β -естрадиол, добавен в ямката на изследването, максимално свързване на [³H]-17 β -естрадиол към hrER α , неспецифично свързване и общо свързване при различни концентрации на изпитвания химикал). Една серия може да се състои и само от една ямка за изследване (т.е. повторение) на концентрация, но тъй като настоящият протокол изисква трикратен анализ, една серия се състои от три ямки за изследване на концентрация. Освен това настоящият протокол изисква три независими (т.е. непаралелни) серии на химикал.

Допълнение 3,2

СХЕМА НА ЯМКА НА СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА СВЪРЗВАНЕ

Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
S	A1	1	Празно	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Празно	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Празно	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	студен E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	студен E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	студен E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	студен E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	студен E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	студен E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	студен E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	студен E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	студен E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	студен E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	студен E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	студен E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	студен E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	студен E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	студен E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	студен E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	студен E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	студен E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	студен E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	студен E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	студен E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	норетинодрел	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	норетинодрел	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	норетинодрел	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	норетинодрел	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	норетинодрел	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	норетинодрел	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	норетинодрел	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	норетинодрел	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	норетинодрел	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	норетинодрел	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	норетинодрел	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	норетинодрел	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	норетинодрел	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	норетинодрел	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	норетинодрел	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	норетинодрел	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	норетинодрел	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	норетинодрел	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	норетинодрел	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	норетинодрел	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	норетинодрел	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване

Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (М)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (М)
S	H4	1	норетинодрел	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	норетинодрел	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	норетинодрел	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	общо свързване	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	общо свързване	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	общо свързване	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	общо свързване	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	общо свързване	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	общо свързване	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	студен E2	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	студен E2	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	студен E2	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	студен E2	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	студен E2	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	студен E2	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Контрола на	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Контрола на	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Контрола на	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Контрола на	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Контрола на	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Контрола на	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Празна (за	Горещ	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Празна (за	Горещ	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Празна (за	Горещ	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Празна (за	Горещ	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Празна (за	Горещ	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Празна (за	Горещ	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Имайте предвид, че „горещите“ ямки са празни по време на инкубация. 10 μl се добавят само за сцинтилационно

броене.

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване												
Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
P1	A1	1	Неизвестен 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Неизвестен 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Неизвестен 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Неизвестен 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Неизвестен 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Неизвестен 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Неизвестен 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Неизвестен 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Неизвестен 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Неизвестен 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Неизвестен 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Неизвестен 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Неизвестен 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Неизвестен 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Неизвестен 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Неизвестен 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Неизвестен 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Неизвестен 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Неизвестен 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Неизвестен 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Неизвестен 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Неизвестен 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Неизвестен 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	Неизвестен 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Неизвестен 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Неизвестен 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Неизвестен 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Неизвестен 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Неизвестен 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Неизвестен 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Неизвестен 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Неизвестен 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Неизвестен 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Неизвестен 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Неизвестен 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Неизвестен 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Неизвестен 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Неизвестен 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Неизвестен 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Неизвестен 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Неизвестен 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Неизвестен 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Неизвестен 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Неизвестен 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Неизвестен 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Неизвестен 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Неизвестен 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Неизвестен 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Схема на ямка на сравнително изследване на свързване												
Плоча	Местоположение	Повторение	Тип ямка	Код на ямка	Код на концентрация	Първоначална концентрация на конкурента (M)	Запас на hrER (μl)	Обем на буфера (μl)	Обем на маркера (Горещ E2) (μL)	Обем от плака за разреждане (μL)	Окончателен обем (μl)	Окончателна концентрация на конкурента (M)
P1	A7	1	Неизвестен 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Неизвестен 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Неизвестен 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Неизвестен 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Неизвестен 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Неизвестен 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Неизвестен 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Неизвестен 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Неизвестен 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Неизвестен 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Неизвестен 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Неизвестен 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Неизвестен 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Неизвестен 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Неизвестен 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Неизвестен 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Неизвестен 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Неизвестен 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Неизвестен 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Неизвестен 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Неизвестен 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Неизвестен 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Неизвестен 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Неизвестен 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Контрола E2	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Контрола E2	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Контрола E2	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Контрола E2	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Контрола E2	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Контрола E2	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Контрола NE	S	Nemax1	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Контрола NE	S	Nemax2	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Контрола NE	S	Nemax3	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Контрола NE	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Контрола NE	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Контрола NE	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	студен E2	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	студен E2	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	студен E2	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	студен E2	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	студен E2	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	студен E2	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	общо свързване	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	общо свързване	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	общо свързване	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	общо свързване	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	общо свързване	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	общо свързване	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

Допълнение 4

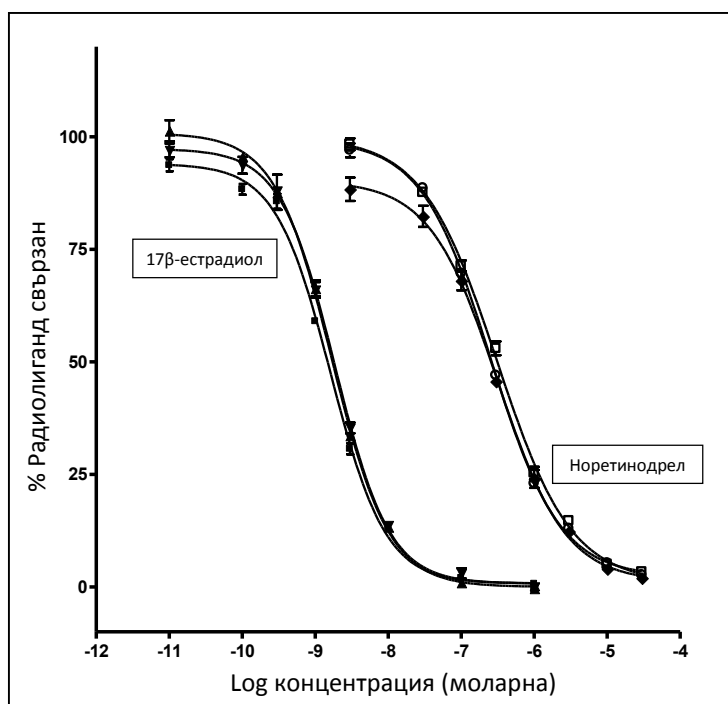
СЪОБРАЖЕНИЯ ЗА АНАЛИЗА НА ДАННИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО ЗА КОНКУРЕНТНО СВЪРЗВАНЕ НА hrER

1. Изследването за конкурентно свързване на hrER α измерва една концентрация на [^3H]-17 β -естрадиол в присъствието на увеличаващи се концентрации на изпитван химикал. Кривата на конкурентно свързване се изчертава като специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол спрямо концентрацията (log10 единици) на конкурента. Концентрацията на изпитвания химикал, която инхибира 50% от максималното специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол, е IC₅₀.

Анализ на данни за референтния естроген и слабо свързващо вещество (1)

2. Данните от контролните серии се преобразуват (т.е. процент на специфично свързване на [^3H]-17 β -естрадиол и логаритмичната концентрация на контролния химикал) за допълнителен анализ. Оценките на логаритмичните (IC₅₀) стойности за положителните контроли (напр. референтен естроген и слабо свързващо вещество) следва да се определят с използване на подходящ софтуер за нелинейно налагане на крива за вписване на уравнението на Хил с четири параметъра, т.е. (напр. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Горната част, долната част, наклонът и логаритмичната стойност (IC₅₀) обикновено могат да се оставят неограничени при налагането на тези криви. Следва да се използва надеждна регресия, когато се определя най-доброто съвпадение, освен ако не е предоставена обосновка. Избраният метод за надеждна регресия следва да бъде посочен. Корекция за изчерпване на лиганд не е необходима за изследванията FW или CER1 hrER, но може да се обмисли при нужда. След първоначалния анализ всяка крива на свързване следва да се прегледа, за да се гарантира подходящо налагане върху модела. Относителният афинитет на свързване (RBA) за слабо свързващо вещество може да се изчисли като процент на логаритъма (IC₅₀) за слабото свързващо вещество по отношение на логаритъма (IC₅₀) за 17 β -естрадиол. Резултатите за положителните контроли и контролата на несвързващо вещество следва да се оценят с използване на измервания на ефективността на изследването и критериите за приемливост, както са описани в настоящия метод за изпитване (точка 20), Допълнение 2 (изследване на FW, точки 41-51) и Допълнение 3 (изследване на CER1, точки 41-51). Примери на 3 серии за референтния естроген и слабо свързващо вещество са показани на Фигура 1.

Фигура 1. Примери на криви на конкурентно свързване за референтния естроген и контролното слабо свързващо вещество.



Анализ на данните за изпитвани химикали

3. Данните за всички изпитвани химикали следва да се анализират с използване на поетапен подход, за да се гарантира, че данните са анализирани по подходящ начин и че всяка крива на конкурентно свързване е правилно класифицирана. Всяка серия за даден изпитван химикал следва първо да премине през стандартизиран анализ на данни, който е идентичен на този, използван за референтния естроген и контролите на слабо свързващо вещество. След приключването му следва да се извърши технически преглед на параметрите на налагане на кривата, както и визуален преглед доколко добре данните съвпадат с генерираната крива на конкурентно свързване за всяка серия. По време на този технически преглед наблюденията на зависимо от концентрацията намаляване на процента на специфично свързан [^3H]-17 β -естрадиол, слабата променливост измежду техническите повторения при всяка концентрация на химикала и съгласуваността на параметрите на налагане в трите серии са добър индикатор, че изследването и анализите на данни са проведени по подходящ начин. Необходимо е да се приложи професионална обосновка, когато се преглеждат резултатите от всяка серия за даден изпитван химикал и данните, използвани за класифициране на всеки изпитван химикал като свързващ или несвързващ, следва да са оправдани от научна гледна точка.
4. От време на време е възможно да има примерни данни, които изискват допълнително внимание за подходящо анализиране и тълкуване на данните за свързване с hrER.

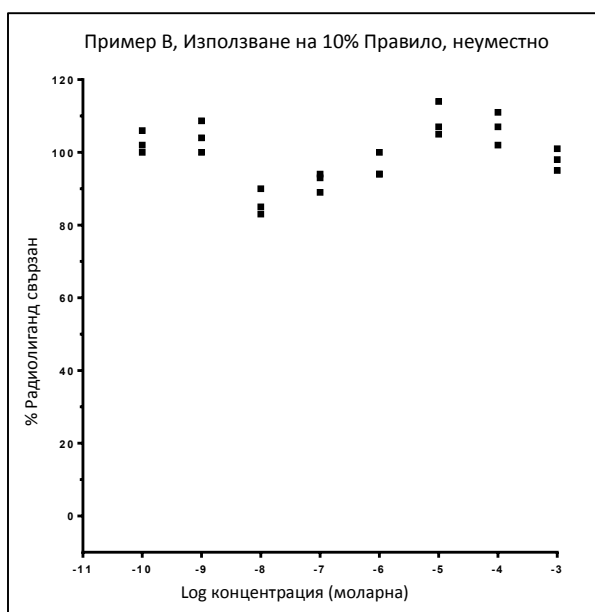
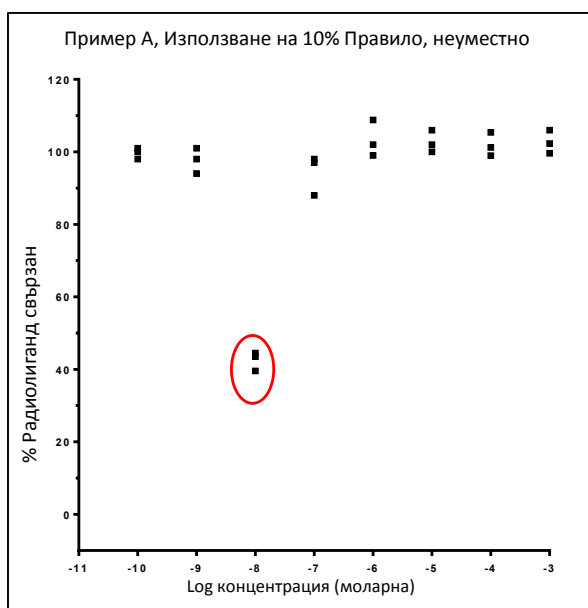
Предишните проучвания демонстрираха случаи, при които анализът и тълкуването на данните за конкурентно свързване на рецептор могат да бъдат усложнени от промяна на процента на специфично свързване, когато се изпитват химикали при най-високи концентрации (Фигура 2). Това е добре известен проблем, който се среща при използване на протоколи за редица изследвания на конкурентно свързване на рецептор (3). В тези случаи зависимият от концентрацията отклик се наблюдава при по-ниски концентрации, но тъй като концентрацията на изпитвания химикал се доближава до границата на разтворимост, изместването на [^3H]17 β -естрадиол повече не намалява. В тези случаи данните за по-високи концентрации сочат, че е достигната биологичната граница на изследването. Например този феномен много пъти е свързан с химична неразтворимост и преципитация при високи концентрации или може да е също така отражение на превишаването на капацитета на покрития с декстран въглен да улови несвързания радиомаркиран лиганд по време на процедурата на отделяне при най-високите химични концентрации. Оставянето на тези точки с данни при налагане на данни за конкурентно свързване върху сигмоидна крива понякога може да доведе до неправилно класифициране на потенциала за свързване на ER за даден изпитван химикал (Фигура 2). За да се избегне това, протоколът на изследванията за свързване на hrER на FW и CER1 hrER включва опция за изключване от анализите на точки с данни, където средната стойност на повторенията за процента на специфично свързан [^3H]17 β -естрадиол е 10 % или повече над наблюдавания за средната стойност при по-ниска концентрация (т.е. това често се нарича правилото на 10 % процента). Това правило може да се използва само един път за дадена крива и трябва да има оставащи данни за поне 6 концентрации като тази, при която кривата може да бъде вярно класифицирана.

Фигура 2: Примери, криви на конкурентно свързване със и без използване на правилото на 10 %.



5. Подходящата употреба на правилото на 10 % за корекция на тези криви следва внимателно да се обмисли и да се запази за тези случаи, когато има силна индикация за свързващо се с hrER вещество. По време на провеждането на експерименти за изследването за валидиране на изследването за свързване на hrER на FW е наблюдавано, че правилото на 10 % понякога води до нежелани и непредвидими последствия. Химикали, които не взаимодействат с рецептора (т.е. реални несвързващи се вещества) често показват вариабилност около 100 % свързване на радиолиганд, което е по-голямо от 10 % в диапазона на изпитваните концентрации. Ако се случи, че най-ниската стойност е при ниска концентрация, данните за всички по-високи концентрации вероятно могат да бъдат изтрети от анализа чрез използване на правилото на 10 %, макар че тези концентрации могат да са полезни за определянето, че химикалът не е свързващо се вещество. Фигура 3 показва примери, когато употребата на правилото на 10 % не е подходяща.

Фигура 3: Примери, данни за конкурентно свързване, когато употребата на правилото на 10 % не е подходяща.



Препратки